

Aus dem Institut für Medizin
der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Direktor: Prof. Dr. med. L. E. Feinendegen

**Zellkinetische Untersuchungen in vitalen
und nekrotischen Tumorbereichen:
Anwendbarkeit der Verlustratenmessung
mit ^{125}J oddesoxyuridin**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rainer Porschen

1981

Aus dem Institut für Medizin
der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Direktor: Prof. Dr. med. L. E. Feinendegen

**Zellkinetische Untersuchungen in vitalen
und nekrotischen Tumorbereichen:
Anwendbarkeit der Verlustratenmessung
mit ^{125}J oddesoxyuridin**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rainer Porschen

Inhaltsverzeichnis
Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe.

Die Arbeit ist von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden.
Die experimentellen Untersuchungen habe ich selbständig am Institut für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich (Direktor: Prof. Dr. med. L.E. Feinendegen) durchgeführt.

Jülich, den 21. Oktober 1979

Rainer Ponder

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Referent
gez.: Prof.Dr. Feinendegen

gez.: Prof.Dr. Straßburg

Korreferent
gez.: Prof.Dr. Vieten

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1. Blutversorgung der Tumoren	3
2.1.1. Tumorangiogenese	3
2.1.2. Gefäßaufbau und Blutfluß	5
2.2. Tumorzellkinetik	8
2.2.1. Tumorwachstum	8
2.2.2. Analyse der zellkinetischen Parameter	11
2.2.3. Veränderungen der zellkinetischen Parameter während des Tumorwachstums	21
2.2.4. Tumorkinetik und Vaskularisation	24
3. Material und Methode	29
3.1. Versuchstiere und ihre Haltung	29
3.2. Tumor und Tumorumplantation	32
3.3. Tumorumvolumenmessung	36
3.4. Das Thymidinanalogon Joddesoxyuridin (J-UdR)	38
3.4.1. Physikalische Eigenschaften der Jodisotope	38
3.4.2. Biochemie und Kinetik des J-UdR-Einbaus	41
3.5. Tumormessplatz	44
3.6. Bestimmung der Aktivitätsverlustrate	46
3.7. Ganzkörperzähler	49
3.8. Messung des nekrotischen Anteils	50
3.9. Herstellung toter markierter Zellen	52

	Seite
4. Ergebnisse	54
4.1. Tumorwachstum und Serientransplantation	54
4.2. Bestimmung der Tumorzelldosis ₅₀ (TD ₅₀)	61
4.3. Toxizität von Joddesoxyuridin	62
4.4. Einbau von ¹²⁵ J-UdR in C57 BL/6 J Mäusen	68
4.5. Anflutung von ¹²⁵ Joddesoxyuridin in den Tumor	70
4.6. Abschätzung des Anteils nicht DNA-gebundener ¹²⁵ J-Aktivität	73
4.7. ¹²⁵ Jod-Retention bei verschiedenen Tumervolumina	74
4.8. ¹²⁵ J-Aktivitätsverteilung zwischen nekrotischem und vitalem Tumorgewebe	77
4.9. Aktivitätsretention im Tumor nach Injektion toter markierter Zellen	80
4.9.1. In-vitro Markierung	80
4.9.2. In-vivo Markierung	85
5. Störmöglichkeiten der Bestimmung des Aktivitätsverlustes und ihr Einfluß beim Mammacarcinom EO 771	87
5.1. Hautaktivität	87
5.2. Nicht DNA-gebundene Radioaktivität	89
5.3. Einwanderung markierter Zellen	91
5.4. Toxizität des DNA-Vorläufers	95
5.5. Resorption nekrotischen Gewebes	98
5.6. Wiederverwertung	103
6. Berechnung zellkinetischer Parameter und Tumorwachstumsbetrachtungen	107
7. Zusammenfassung	122
8. Literaturverzeichnis	124

1. Einleitung

In ausgewachsenen, gesunden, vielzelligen Organismen besteht ein Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zellverlust (Cooper, 1973; Feinendegen, 1971). Dahingegen handelt es sich bei Tumoren um abnorme Gewebsmassen, die durch eine autonome, progressive und überschüssende Proliferation körpereigener Zellen entstehen (Sandritter & Benecke, 1974).

Neben dem Anteil der proliferierenden Zellen an der Gesamt-tumorzellzahl ("growth fraction") und neben der Zellzykluszeit beeinflusst das Ausmaß des Zellverlusts wesentlich die Wachstumsgeschwindigkeit menschlicher und tierischer Tumoren. Die Zellverlustrate läßt sich aus der Differenz der autoradiographisch ermittelten Zellproduktionsrate und der relativen Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors berechnen (Steel, 1967, 1968). Da diese indirekte Technik sehr zeitaufwendig ist, war es wünschenswert, eine direkte und einfachere Methode zu entwickeln.

Dies läßt sich durch Markierung der Zellen mit radioaktiven DNA-Vorläufern, hauptsächlich mit Joddesoxyuridin (J-UdR), erreichen.

Die Abnahme der Radioaktivität mit der Zeit nach Injektion ist ein Maß für den Zellverlust (Begg, 1975, 1977; Clifton & Yatvin, 1970; Commerford 1965; Dethlefsen, 1969, 1971; Feinendegen et al., 1966a, 1973; Hofer et al., 1969, 1970; Hughes et al., 1964, Jenkinson et al., 1975; Okumura et al., 1973; Pittner, 1971; R. Porschen et al., 1980; Porschen & Feinendegen 1969, 1973; Sommer, 1976).

Die nicht-invasive Messung des Zellverlusts ist weiterhin anzustreben, da die Größe des Zellverlusts möglicherweise

das Ergebnis fraktionierter Tumorbehandlung bestimmt, was durch die Korrelation von Zellverlust und Tumorregression bzw. Reoxygenation angezeigt wird (Begg, 1975; Denekamp, 1972; Porschen et al., 1977).

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Zellverlust-rate eines soliden Experimentaltumors mit Hilfe der von Porschen und Feinendegen entwickelten externen J-UdR-Meßmethode (1969) in Abhängigkeit vom Tumorzvolumen zu bestimmen und auf Störmöglichkeiten der direkten Zellverluststraten-messung hinzuweisen.

Weiterhin ist versucht worden, das Wachstumsverhalten des Mammaadenocarcinoms mit zusätzlich ermittelten zellkineti-schen Parametern zu beschreiben.

2. Grundlagen

2.1. Blutversorgung der Tumoren

2.1.1. Tumorangiogenese

2.1.2. Gefäßaufbau und Blutfluß

2.2. Tumorzellkinetik

2.2.1. Tumorwachstum

2.2.2. Analyse der zellkinetischen Parameter

2.2.3. Veränderungen der zellkinetischen Parameter während des Tumorwachstums

2.2.4. Tumorkinetik und Vaskularisation

2.1. Blutversorgung der Tumoren

Bei Protozoen und einigen Schwämmen erfolgen Stofftransporte mit Hilfe der Diffusion bzw. spezialisierter Einzelzellen (Amöbozyten). So wie die Evolution vom ein- zum vielzelligen Organismus von der Entstehung eines flüssigkeitsgefüllten Transporthohlraumsystems abhängig war, ist die einzelne Tumorzelle auf eine Blutversorgung angewiesen, um eine makroskopisch sichtbare Tumormasse bilden zu können; ohne eine Vaskularisierung des Tumors findet kein autonomes Wachstum statt (Algire & Chalkley, 1945; Folkman, 1974).

2.1.1. Tumorangiogenese

Im Gegensatz zu Transplantaten normalen Gewebes sterben die Gefäße von Tumortransplantaten gewöhnlicherweise ab (Merwin & Algire, 1956), so daß der Stoffaustausch des Tumors mit der Umgebung zuerst durch Diffusion erfolgt. Im avaskulären Stadium wird das Tumorwachstum durch die Diffusionslänge der

Substrate begrenzt (Folkman et al., 1971; Folkman, 1974). Zwei bis vier Tage nach Implantation des Tumors dilatieren die benachbarten Wirtsgefäße und solide Kapillarsprossen, die später kanalisiert werden, wachsen in den Tumor ein. Bei der Transplantation gesunden Gewebes proliferieren die Wirtskapillaren erst nach sechs Tagen. (Algire & Chalkley, 1945; Cavallo et al., 1972; Folkman, 1974; Goldmann, 1907; Ide et al., 1939; Merwin & Algire, 1956; Schoefl, 1963; Warren & Shubik, 1966).

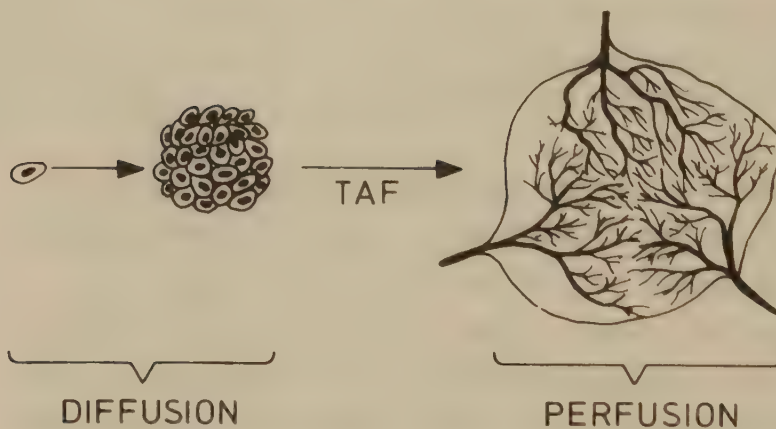


Abb. 2.1.1.: Die durch die Wirkung des Tumorangio-genese-faktors (TAF) gebildeten Gefäße versorgen den Tumor mit Nährstoffen (nach Folkman et al., 1971).

Die angioplastische Fähigkeit der Tumorzellen wird durch einen im Kern und Zytoplasma der Tumorzellen befindlichen Tumorangio-genese-faktor (TAF) vermittelt (Abb. 2.1.1.). Er regt über eine Entfernung von ein bis drei Millimeter die Proliferation des Endothels an (Bagshawe, 1975; Cavallo

et al., 1972; Folkman et al., 1971; Folkman, 1974, Goldmann, 1911).

Während das Endothel normalerweise nur eine äußerst geringe DNA-Synthese aufweist (Engerman et al., 1967), wird Thymidin schon 6-8 Stunden nach Injektion von Karzinomzellen verstärkt in das Endothel des Wirtstieres eingebaut (Cavallo et al., 1972; Folkman et al., 1971).

Das epidermoide Kaninchencarcinom V2 ist jedoch nicht in der Lage, eine Proliferation der Wirtsgefäße anzuregen, sondern ummauert die Gefäße des Transplantationsortes (Williams, 1951).

2.1.2. Gefäßaufbau und Blutfluß

Das schnelle Wachstum der Blutgefäße der Neoplasmen führt zu einem unvollkommenen Wandaufbau und zu einer regellosen, verworrenen Gefäßarchitektur. Da die Wand der neugebildeten Gefäße oft nur aus einem einschichtigen, zerrissenen Endothelschlauch und einer verdickten Basalmembran besteht, können sich Mikrothromben abscheiden und Blut ins Gewebe austreten. Die Gefäße differenzieren sich nicht in Arteriolen oder Venulen und weisen keine Innervation auf. Deshalb ist die Fähigkeit zur Kreislaufregulation stark herabgesetzt (Abrams, 1964; Algire & Chalkley, 1945; Cavallo et al., 1972; Coutelle, 1956, Goldacre & Sylvén, 1962; Ide et al., 1939; Manuelidids & Dolin, 1969; Nyström, 1959; Ribbert, 1904; Rubin & Casarett, 1966a; Schoefl, 1963; Warren & Shubik, 1966; Williams, 1951).

Mit steigendem Tumolvolumen geht die anfänglich homogene Verteilung der Blutgefäße in eine heterogene über: Die zentralen Anteile des Tumors werden schlechter durchblutet, während die Gefäße in der Peripherie bestehen bleiben. In den zentralen Bezirken sind mikroskopisch Gefäße zu erkennen, die aber vermindert oder überhaupt nicht durchströmt werden, weil sie wegen des erhöhten

Tumorrinnendrucks kollabiert sind (Goldacre & Sylvén, 1962; Ide et al., 1939; Shapiro & Landing, 1948; Tannock & Steel, 1969; Warren & Shubik, 1966; Williams, 1951).

Dank der Entwicklung neuer Techniken und der Verwendung radioaktiv markierter Substanzen ist es möglich geworden, den Blutfluß und das funktionelle Blutvolumen quantitativ zu erfassen. Während Bierman (1952) aus dem hohen Sauerstoffgehalt venösen Blutes menschlicher Tumoren auf eine beträchtliche Anzahl arteriovenöser Shunts und einen höheren Blutfluß gegenüber normalen Geweben schloß, berichteten Gullino und Grantham (1964) daß die Perfusion verschiedener Transplantationstumoren um ein Vielfaches unter dem ihrer Muttergewebe liegt. Außerdem zeigten diese Tumoren in Bezug auf die Blutversorgung ein einheitliches Verhaltensmuster, unabhängig vom histologischen Typ, Implantationsort und Tumolvolumen. Den hohen Blutfluß kleiner Tumoren führten sie darauf zurück, daß die Messungen bei kleinen Tumorumfängen zum größten Teil die Blutversorgung des Wirtsorgans erfassen.

Der überwiegende Teil der Veröffentlichungen über die Blutversorgung von Tumoren kommt jedoch zu folgenden Ergebnissen (Abb. 2.1.2.):

- 1) Die Entfernung zwischen zwei Kapillaren vergrößert sich bei großen Tumoren, gleichzeitig sinkt der Blutfluß ab. Sobald die interkapilläre Distanz die Diffusionslänge des Sauerstoffs überschreitet oder die Perfusion stark herabgesetzt ist, entwickeln sich nekrotische Bereiche. Parallel dazu steigt der mittlere Gefäßdurchmesser an (Bagshawe, 1975; Cataland et al., 1962; Day, 1964; Gewehr, 1977; Inch & McCredie, 1968; Kolstad, 1964; Lewis et al., 1968; Robert et al., 1967; Rogers et al., 1967; Tanaka, 1974; Tannock & Steel, 1969; Tannock, 1970; Thomlinson & Gray, 1956; Vogel 1965).

- 2) Nur die Perfusion sehr kleiner Tumoren übersteigt die von Muskulatur und Haut, während sie bei großen Tumorumfängen unter die Blutflußwerte normaler Gewebe absinkt (Gullino & Grantham, 1961; Gump & White, 1968; Robert et al., 1967; Rogers et al., 1967).
- 3) Der Blutfluß in den Tumoren weist regionale Unterschiede auf (Gosalvez et al., 1972; Gump & White, 1968; Kolstad, 1964; Robert et al., 1967).

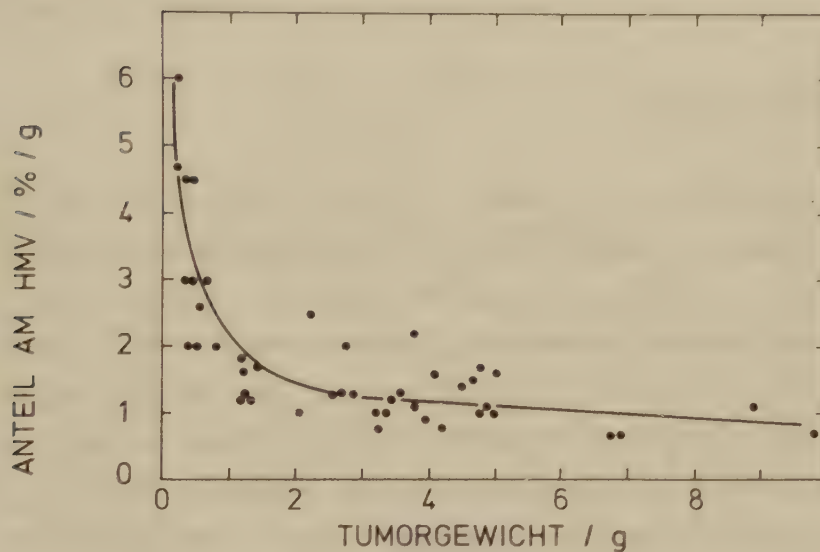


Abb. 2.1.2.: Beziehung zwischen Tumorblutfluß und Tumorgewicht beim Mammaadenocarcinom 755. Der Blutfluß ist angegeben in Prozent des Herzminutenvolumens (HMV)/g Tumorgewebe (nach Cataland et al., 1962).

2.2. Tumorzellkinetik

Zellkinetik ist ein neuer Zweig der Biologie, der sich mit der Erforschung der Zeitparameter im Wachstum gesunder und neoplastischer Gewebe beschäftigt. Die erfolgreiche Behandlung maligner Geschwülste durch Bestrahlung, zytotoxische Medikamente oder andere Mittel beruht darauf, Unterschiede im Verhalten des gesunden und des neoplastischen Gewebes zu erkennen und für die Therapie zu nutzen. Hierzu kann auch die Zellkinetik ihren Beitrag leisten; ist doch die hohe Mitosefrequenz eins der histologischen Charakteristika der Tumoren.

2.2.1. Tumorstadium

Experimentaltumoren, die unter konstanten Bedingungen serialtransplantiert werden, sind ein Assaysystem der Krebsforschung. Ihre Größe kann aus Messungen der Zellzahl, der exzidierten Tumormasse oder des Durchmessers bestimmt werden (Blum, 1943; Steel, 1977). Trägt man das Tumorstadium gegen die Zeit nach Implantation auf, so läßt sich aus der an die Wachstumskurve angelegten Tangente die Verdopplungszeit T_D/h , die absolute Wachstumsgeschwindigkeit $dV/dt / \text{mm}^3/h$ und die relative Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}/V/h^{-1}$ errechnen (Abb. 2.2.1.).

Simpson-Herren (1975) zeigte, daß das Verhalten der Tumormasse nur bedingt auf die Tumorzellpopulation übertragen werden kann, da viele Tumoren nekrotisches Material, Zysten und Stroma enthalten und der Anteil der Tumorzellen am Tumorstadium während des Wachstums absinkt (Erbe et al., 1977; Inch & McCredie, 1968; Lala, 1972; Lewis et al., 1968; McCredie et al., 1971; Schatten, 1962; Spencer & Lang, 1976).

Für viele Experimentaltumoren, die nur über einen sehr be-

grenzten Volumenbereich einem einfachen exponentiellen Wachstumsgesetz folgen und deren relative Wachstumsgeschwindigkeit stetig abnimmt (Abb. 2.2.1.), läßt sich das Wachstum durch die Gompertz-Funktion beschreiben (Burton, 1966; Laird, 1964, 1965; Steel, 1977):

$$V = V_0 \cdot e^{\frac{A}{\alpha} (1 - e^{-\alpha \cdot t})} \quad (1)$$

Dabei entspricht V_0 dem Tumolvolumen zum Zeitpunkt $t=0$ und A und α sind Konstanten.

Für kleine Zeitintervalle nach Implantation reduziert sich die Funktion zu

$$V = V_0 \cdot e^{At} \quad (2)$$

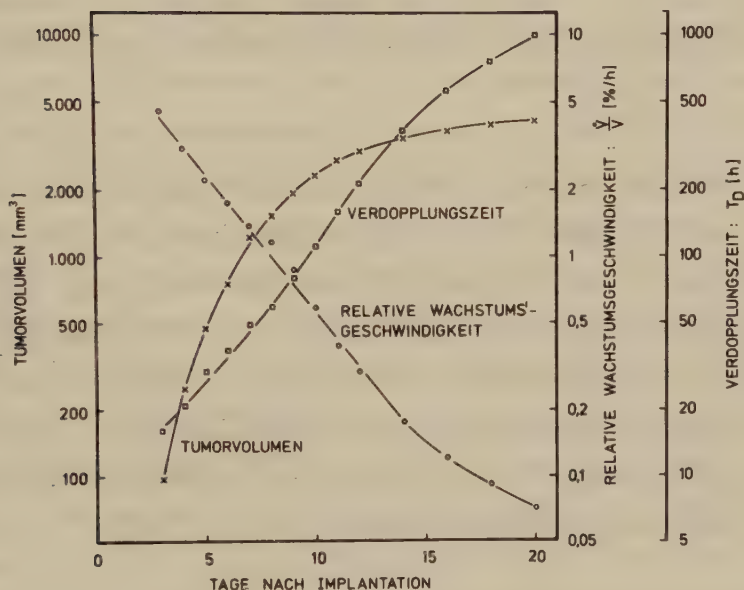


Abb. 2.2.1.: Tumorkinetische Parameter des Sarkoms 180, die aus der Tumolvolumenkurve ermittelt werden, in Abhängigkeit von der Zeit nach Implantation (nach Mühlensiepen & Porschen, 1976).

Das Tumorstadium strebt einem asymptotischen Maximum zu, das sich berechnen läßt nach

$$V = V_0 \cdot e^{A/\alpha} \quad (3)$$

Somit kann die Gompertz-Funktion als einfacher exponentieller Prozeß betrachtet werden, der mit der Zeit exponentiell verzögert wird:

$$T_D = \frac{\ln 2}{A} \cdot e^{\alpha t} \quad (4)$$

Laird (1964) führte die Verzögerung auf eine Zunahme der Zellzykluszeit ohne Veränderung in der "growth fraction" und/oder auf einen Verlust der teilungsfähigen Zellen zurück.

Nach Mayneord (1932) nimmt der Durchmesser oder die Kubikwurzel des Tumorstadiums linear mit der Zeit zu, wenn das Wachstum auf die Tumorstadiumperipherie begrenzt ist. Diese lineare Beziehung besteht aber auch bei Tumoren, bei denen eine solch strenge topographische Einteilung nicht beobachtet werden kann (Steel, 1977).

Unter der Annahme, daß die Versorgung der Tumoren nur durch Diffusion der Nährstoffe von einer Kugeloberfläche her erfolgt und Zelltod durch unzureichende Sauerstoffversorgung hervorgerufen wird, entwickelte Burton (1966) eine Diffusionsgleichung, mit der sich die Anteile der nekrotischen und lebensfähigen Gebiete am Tumorstadium berechnen lassen. Dabei wird nicht berücksichtigt, daß auch in den zentralen Tumorstadiumbezirken eine Blutversorgung bestehen kann (Rogers et al., 1967).

Das Wachstum des C3H Mammapcarcinoms folgt der Potenzfunktion $V_p = g \cdot V^b$, wobei g ein Proportionalitätsfaktor ist, b den Wachstumsmodus bestimmt und V_p dem proliferierenden Tumorstadiumvolumen entspricht. Diese Funktion beschreibt das Kubikwurzelwachstum, wenn b den Wert $2/3$ annimmt. Mendelsohn (1965) konnte aus dieser Wachstumsgleichung bei Kenntnis der Zellzykluszeit die "growth fraction" bestimmen.

2.2.2. Analyse der zellkinetischen Parameter

In idealisierten Populationen können Tumorzellen aufgrund ihres Proliferationsstatus zwei verschiedenen Kompartments zugeordnet werden. Nicht-proliferierende Zellen (Q-Zellen), deren Versorgung mit Substraten und Sauerstoff unzureichend ist (Tannock, 1968; Tannock & Steel, 1970), treten nicht in die DNA Synthese oder die Mitose ein. Proliferierende Zellen (P-Zellen) durchlaufen den Zellzyklus mit einer einheitlichen Zykluszeit t_c . Während P-Zellen direkt in der Mitose beobachtet oder durch ihre Fähigkeit, markierte DNA-Vorläufer aufzunehmen, erkannt werden können, ist die experimentelle Zuordnung von morphologisch intakten Zellen zum Q-Kompartiment mit Schwierigkeiten behaftet (Caspersson & Santesson, 1942; Lamerton, 1969; Steel, 1977).

Die Dauer des Zellzyklus und seiner Phasen läßt sich mit Hilfe der "Prozent-markierte Mitosenkurve" (PLM-Kurve) ermitteln. Zu verschiedenen Zeiten nach Injektion von Tritium-Thymidin ($^3\text{H-TdR}$) werden die Tumoren von Versuchstieren entnommen und als Zellsuspensionen oder als histologische Schnitte verarbeitet. Der Anteil markierter Mitosen wird autoradiographisch bestimmt und gegen die Zeit nach Injektion aufgetragen. Das Vorgehen ist dadurch begründet, daß Zellen, die sich zur Zeit der Verabreichung des radioaktiven DNA-Vorläufers in der S-Phase aufhalten, $^3\text{H-TdR}$ einbauen und daß die Passage dieses markierten Zellpakets durch den Zellzyklus aus einem "Fenster", das der Mitose entspricht, verfolgt wird. Die zeitliche Lücke zwischen der Applikation des Thymidins und dem Erscheinen der ersten markierten Mitosen entspricht der Dauer der G_2 -Phase. (Abb. 2.2.2.a).

Die PLM-Kurve sieht sägezahnblattartig und regelmäßig aus, wenn alle proliferierenden Zellen den Zyklus mit der gleichen

- 1) Alle Zellen, die sich in der DNA-Synthese-Phase befinden, bauen ^3H -TdR ein und teilen sich anschließend (Steel, 1972). Beim spontanen C3H Mammacarcinom erreichte der Anteil der markierten Mitosen an der Gesamtzahl der Mitosen nach zehnstündiger Dauerinfusion von Tritium-Thymidin einen Wert von 100 % (Mendelsohn, 1965). Auch die Beobachtungen von Tannock (1968), daß der Markierungsindex mit zunehmender Entfernung von Blutgefäßen in gleicher Weise wie der Mitoseindex abnimmt und daß die Höhe des ersten Gipfels der PLM-Kurven unabhängig ist von der Größe dieser Entfernung, sprechen für die Berechtigung dieser Annahme.
- 2) Metabolischer Umsatz der DNA und Wiederverwertung des markierten Vorläufers beeinflussen die Messung nicht (Lamerton, 1969; Steel, 1968). In Geweben mit einer hohen Umsatzrate tritt der erste Effekt wohl kaum in Erscheinung (Lamerton, 1969). Wiederverwertung von ^3H -TdR ist erst dann möglich, wenn dieser DNA-Vorläufer aus abgestorbenen Zellen freigesetzt wird. Da jedoch in den Organen, die wegen ihrer hohen Einbaurate als hauptsächliche Quellen für die Wiederverwertung in Betracht kommen, der Zelltod nicht unmittelbar nach Injektion eintritt (Feinendegen et al., 1973; Heiniger et al., 1970; Hughes et al., 1964; Steel, 1966) und das Beobachtungsintervall klein ist, fällt die Reutilisation von Thymidin für die Bestimmung der PLM-Kurven von Experimentaltumoren möglicherweise kaum ins Gewicht. Bevor der Zellverlust einsetzt, besteht auch bei einigen Transplantationstumoren nach Injektion von markierten DNA-Vorläufern ein Aktivitätsplateau (Dethlefsen et al., 1977; Porschen & Feinendegen, 1973).
- 3) Die PLM-Kurve repräsentiert das Verhalten der P-Zellen. Sie ist jedoch unempfindlich für Zellen mit einer langen intermitotischen Zeit, da solche selten im Teilungsstadium ge-

sehen werden (Steel, 1972), d.h. die Verteilung der Zykluszeit wird als unimodal vorausgesetzt.

- 4) Die Kinetik der beobachteten Zellpopulationen wird durch die Wirkung auf den Thymidinpool oder durch die β -Strahlung der verwendeten Isotope nicht gestört.

Die Pooleffekte können durch die Applikation von radioaktiven Tracern mit hoher spezifischer Aktivität verhindert werden (Feinendegen, 1977). Unter in-vivo Bedingungen werden die PLM-Kurven in einem Dosisbereich von 0,25-5,0 $\mu\text{Ci } ^3\text{H-TdR/g}$ Körpergewicht nicht beeinflusst (Steel et al., 1966).

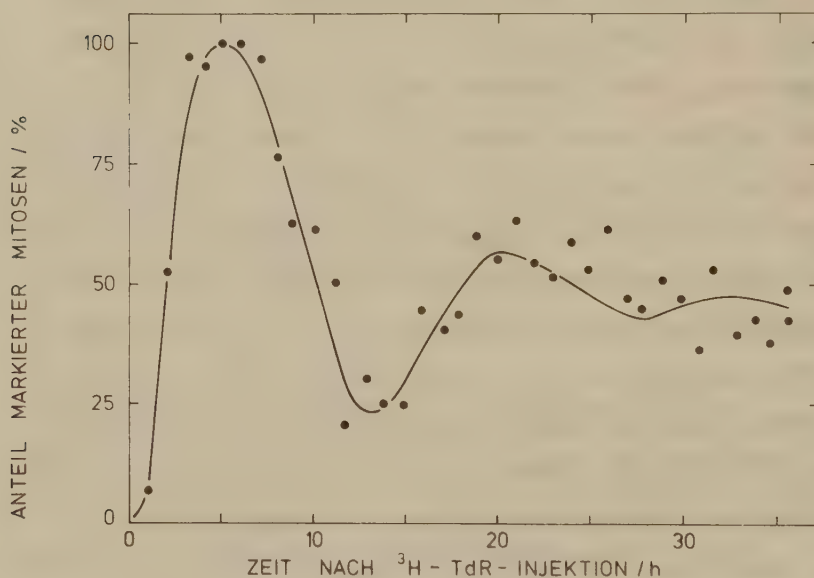


Abb.2.2.2.b: Experimentell ermittelte PLM-Kurve
(Nach Watson, 1976a).

Aus der PLM-Kurve lassen sich ablesen (Abb. 2.2.2.a,b):

$t_{G_2 + 1/2 M} =$ mittlere Dauer der G_2 - und die Hälfte der

Mitosephase, sie ergibt sich aus der Zeit zwischen Injektion und dem Zeitpunkt, zu dem 50 % aller Mitosen erstmals markiert sind. Wenn $^3\text{H-TdR}$ nicht zu allen proliferierenden Zellen gelangt oder die Dauer der G_2 -Phase schwankt, erreicht der erste Gipfel nicht den 100 % Wert.

t_s = mittlere Dauer der S-Phase, sie wird bestimmt aus der Zeitdifferenz zwischen den 50 % Werten des an- und des absteigenden Schenkels des ersten Gipfels. Die Tatsachen, daß die PLM-Kurve in der ersten Mulde keine niedrigen Werte annimmt und der absteigende Schenkel des ersten Gipfels flacher als der ansteigende Schenkel ist, weisen auf eine Streuung der Dauer der S-Phase hin.

t_c = mittlere Zellzykluszeit (Generationszeit, intermitotische Zeit), sie kann aus dem Zeitintervall zwischen dem ersten und dem zweiten Maximum abgelesen werden.

t_{G1} = mittlere Dauer der G_1 -Phase. Sie läßt sich aus der Differenz $t_c - (t_s + t_{G2} + t_M)$ berechnen.

Die Dauer der Mitose wird aus der Beziehung

$$t_M = MI \cdot t_c \quad (5)$$

abgeschätzt. Dabei gibt der Mitoseindex MI den Anteil der Mitosen an der Gesamtzellzahl an.

Da die Zellzyklus- und Phasenzeit innerhalb einer Population einer Streuung unterworfen sind, ergeben sich beträchtliche Unterschiede im Vergleich zur theoretischen Kurve (Abb. 2.2.2.b). Der Synchronisationsverlust der markierten "Zellkohorte" führt dazu, daß der zweite gegenüber dem ersten Gipfel abgeflacht ist und daß die PLM-Kurve nach mehreren Zyklen in ein Plateau ausläuft, dessen Wert dem Verhältnis t_s/t_c , d.h. dem Markierungsindex der proliferierenden Zellen, entspricht. Die Flächen unter den Gipfeln sind gleich, solange Verluste aus dem P-Kompartiment nicht bevorzugt markierte Zellen treffen oder die Radioaktivität der Zellen durch mitotische

Teilung nicht soweit reduziert worden ist, daß sie unterhalb der Zählschwelle liegt (Mendelsohn, 1965; Steel, 1972).

Das Verhältnis der markierten Zellen zur Gesamtzahl lebender Zellen ergibt den Markierungsindex ("labelling index"). Er wird gewöhnlich 1 Stunde nach Injektion von ^3H -TdR bestimmt und repräsentiert den Anteil der zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befindlichen Zellen. Der Markierungsindex der proliferierenden Zellen LI_p berechnet sich aus

$$\text{LI}_p = \mu \frac{ts}{tc} \quad (6)$$

Der Faktor μ ist eine Korrektur für die nicht lineare Altersverteilung der proliferierenden Zellen, da in einer wachsenden Population immer mehr junge als alte Zellen vorhanden sind (Pro Zelle, die die G_2 -Phase verläßt, entstehen zwei G_1 -Zellen). Nur wenn alle Zellen proliferieren, entspricht der Markierungsindex der Tumorzellpopulation LI dem der P-Zellen. Sonst gilt

$$\text{LI} < \text{LI}_p \quad (7)$$

Mendelsohn (1960, 1965) führte 1960 das Konzept des Wachstumsfraktion GF ("growth fraction") ein. Durch sie läßt sich der Anteil der proliferierenden Zellen in einer Population beschreiben:

$$\text{GF} = \frac{P}{P+Q} \quad (8)$$

Die Schlußfolgerung, daß nicht alle Zellen eines Tumors proliferieren, kann aus folgenden Beobachtungen gezogen werden (Mendelsohn, 1965):

- 1) Nach Dauerinfusion von markiertem Thymidin ist der Markierungsindex LI stets niedriger als das Verhältnis markierte Mitosen/Mitosen.

- 2) Der überwiegende Teil der Tumoren wächst nicht exponentiell, sondern die relative Wachstumsgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Tumorgröße ab.
- 3) Die Verdopplungszeit des Tumorumfanges ist größer als die Generationszeit der Tumorzellen. Hierbei spielt aber auch der Zellverlust eine Rolle.

Die "growth fraction" kann aus den Markierungsindizes der gesamten Zellpopulation LI und der proliferierenden Zellen LI_p berechnet werden:

$$GF = \frac{LI}{LI_p} \quad (9)$$

Unter bestimmten Annahmen entspricht die Wachstumsfraktion (Steel, 1967, 1968)

$$GF = d - 1 \quad (10)$$

wobei d die Anzahl der bei jeder Zellteilung gebildeten P-Zellen angibt.

Metastasen und Exulzerationen deuten darauf hin, daß es sich bei Krebsgeschwülsten nicht um abgeschlossene Systeme handelt, sondern daß ein Verlust an lebensfähigen als auch an abgestorbenen Zellen aus Tumoren stattfindet. Somit resultiert das Wachstum einer Tumorzellpopulation aus der Differenz der Zellproduktion $K_p N$ und des Zellverlusts $K_L N$. (Steel, 1968; Abb. 2.2.2.c):

$$\dot{N} = K_p N - K_L N \quad (11)$$

Zellverlust kann durch folgende Mechanismen hervorgerufen werden (Bessis, 1964; Cooper, 1973; Steel, 1967, 1968):

- 1) Metastasierung von Tumorzellen über das Blut- und Lymphgefäßsystem
- 2) Abschlüpfung aus oberflächlich gelegenen Carcinomen

- 3) Zelltod. Zerstreute und vereinzelte nekrotische Zellkerne weisen darauf hin, daß intrinsische Faktoren wie Chromosomenaberrationen und Zellreifung eine Rolle spielen. Andererseits können die Ursachen für den Zelltod auch in einer unzureichenden Blutversorgung oder in Immunreaktionen liegen.

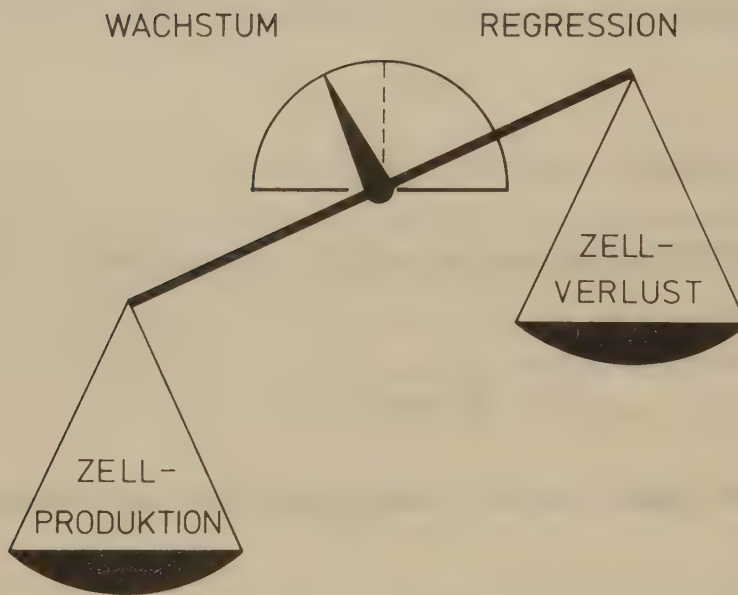


Abb. 2.2.2.c: Das Wachstum eines Tumors resultiert aus der Konkurrenz zwischen Zellverlust und Zellproduktion

Verluste einer exponentiell wachsenden Tumorzellpopulation können aus der gemessenen Tumorverdopplungszeit T_D und der potentiellen Verdopplungszeit T - der Verdopplungszeit in Abwesenheit des Zellverlusts - berechnet werden (Steel, 1967, 1968):

$$T = \lambda \frac{ts}{LI} \quad (12)$$

mit
$$\lambda = \sqrt[u]{\frac{\ln 2}{\ln \alpha} (\alpha - 1)} \quad (13)$$

Für die Zellverlustrate K_L gilt:

$$\begin{aligned} K_L &= \frac{\ln 2}{T} \left(1 - \frac{T}{T_D} \right) \\ &= K_P \left(1 - \frac{T}{T_D} \right) \end{aligned} \quad (14)$$

Der Zellverlustfaktor $\emptyset$ gibt an, in welchem Maße der Wettbewerb zwischen Zellverlust und Zellproduktion das Wachstum beeinflusst:

$$\emptyset = \frac{K_L}{K_P} = 1 - \frac{T}{T_D} \quad (15)$$

Bei einem Zellverlustfaktor von 100 % findet kein Wachstum statt. Wird der Zellverlust als Verlust einer exponentiell wachsenden Population, die aus P- und Q-Zellen besteht, verstanden, kann er mit Hilfe der angegebenen Gleichungen nur berechnet werden, wenn der Markierungsindex sich auf die lebensfähigen Tumorzellen bezieht und wenn die aus externen Messungen bestimmte Verdopplungszeit der Tumormasse der Verdopplungszeit der Tumorzellpopulation entspricht. Beobachtungen haben jedoch gezeigt, daß die Tumormasse mit steigendem Volumen einen zunehmenden Anteil an einwandernden Wirtszellen, Zysten und nekrotischem Material enthält (Kapitel 2.2.1.).

Vergrößert sich das Tumolvolumen infolgedessen schneller als das Volumen der Tumorzellpopulation, werden durch die Verwendung der Verdopplungszeit der Tumormasse die Verluste aus P- und Q-Zellen unterschätzt (Jenkinson et al., 1975; Steel, 1967, 1968). Falls das Tumormodell jedoch neben den P- und Q-Zellen noch den nekrotischen Anteil I_N berücksichtigt, bedeutet der Begriff Zellverlust nicht die Einbuße an proliferativem Potential, sondern Volumenverlust lebensfähiger und toter Zellen. Für seine Berechnung muß der Markierungsindex der lebenden Zellen korrigiert werden (Begg, 1975, 1977):

$$LI_{\text{Tumormasse}} = LI (1 - I_N) \quad (16)$$

Entsprechend verringert sich die Zellverlustrate.

Eine Reihe von mathematischen Modellen sind entwickelt worden, um mit Hilfe gewisser Annahmen erklären zu können, aus welchem Zellkompartiment und nach welchem Modus der Zellverlust erfolgt (Dethlefsen et al., 1977; Roti Roti et al., 1978; Steel et al., 1966).

Neben dieser indirekten Zellverlustratenmessung ist in den letzten Jahren verstärkt versucht worden, den Zellverlust mit Hilfe radioaktiv markierter DNA-Vorläufer direkt zu ermitteln. Wegen der starken Wiederverwertung schlug der Versuch von Steel (1966) fehl, Verluste aus der Abnahme der Tumoraktivität mit der Zeit nach Injektion von Tritium markiertem Thymidin zu bestimmen. Um den ^3H -Gehalt des Tumors messen zu können, müssen die Tiere getötet und das Tumorgewebe für die Flüssigkeitsszintillationszählung aufgearbeitet werden. Durch die Verwendung des Thymidinanalogons 5-Jod-2'-Desoxyuridin (J-UdR) können die für ^3H -TdR geschilderten Probleme umgangen werden: Die γ -Strahlung der beiden Isotope 125-Jod und 131-Jod ermöglicht es, die Tumorradioaktivität in-situ über einen längeren Zeitraum am gleichen Tier zu messen. Seine normalerweise geringere Wiederverwertung resultiert aus der Tatsache, daß die initiale Einbaurate von J-UdR niedriger ist als die von TdR (Begg, 1975, 1977; Clifton & Yatvin, 1970; Dethlefsen, 1969, 1971; Feinendegen et al., 1966a, 1973; Hofer et al., 1969, 1970; Hughes et al., 1964; Jenkinson et al., 1975; Okumura et al., 1973; Pittner, 1971; R. Porschen et al., 1980; Porschen & Feinendegen, 1969, 1973; Sommer, 1976). Diese Methode ist auch insofern vorteilhaft, als durch sie die radio- und chemotherapeutisch induzierte Erhöhung der Zellverlustrate gegenüber den unbehandelten Kontrollen demonstriert werden kann (Begg, 1975; Feinendegen, 1971; Heitmann, 1977; Hofer et al., 1970; Porschen & Feinendegen, 1973). Zeitlich voneinander getrennte Injektionen von Joddesoxyuridin am selben Tier - einmal mit Jod-125 und das andere Mal mit Jod-131 markiert - erlauben Rückschlüsse auf die Strahlenempfindlichkeit von Zellpopulationen unterschiedlicher Sauerstoffversorgung (Feinendegen, 1971, 1976; Gewehr, 1977; Konietzny, 1977; Porschen et al., 1974, 1977, 1978; Weber, 1976).

2.2.3. Veränderungen der zellkinetischen Parameter während des Tumorwachstums

Die Tatsache, daß die Wachstumsparameter experimenteller Tumoren mit zunehmendem Tumolvolumen variieren, ergibt sich aus der allgemeinen Beobachtung, daß die Verdopplungszeiten nicht konstant bleiben, sondern stark ansteigen. Aus Tabelle 2.2.3. läßt sich entnehmen, daß die Generationszeit t_c innerhalb der Fehlergrenzen von der Tumorgröße unabhängig ist. Die Werte des Adenocarcinoms 755 (AC 755) und des Sarkoms 180 (S 180) bei großen Tumolvolumina wurden aus PLM-Kurven ermittelt, deren erste Gipfel nicht die 50 Prozent-Marke erreichen, so daß sie schwer zu interpretieren sind. Mit Ausnahme des Fortner-Plasmocytoms (FP), das auf Hamstern wächst, nimmt die "growth fraction" während des Tumorwachstums ab. Die Zellverlustrate von Tumoren, die bei mehreren Volumina untersucht wurden, zeigt eine schnelle initiale Zunahme, in späteren Wachstumsphasen steigt sie langsam an. Die Zellverlustraten des Sarkoms 180 von Sommer (1976) wurden in-situ mit der J-UdR-Methode, die anderen Werte mit Hilfe autoradiographischer und volumetrischer Messungen bestimmt.

Die Meßwerte des Zellverlustfaktors und der Wachstumsfraktion sind in Abbildung 2.2.3. gegeneinander aufgetragen. Die Position jedes Punktes in diesem Diagramm stellt ein bestimmtes Verhältnis Zellzykluszeit:Verdopplungszeit dar. Die linke untere Ecke der Abbildung repräsentiert Tumoren, die eine hohe Wachstumsfraktion haben und bei denen der Zellverlust klein ist, so daß die Verdopplungszeit ungefähr der intermitotischen Zeit entspricht. Verglichen mit den Veränderungen des Zellverlustfaktors variiert die "growth fraction" während des Tumorwachstums in geringerem Maße (Steel, 1977).

Tumor	V mm ³	T _D h	LI %	MI %	GF %	t _c h	K _L %/h	Ø %	Autor
Fibrosarcom NCTC 2472 (NCTC)	10 80 2300	24 38 110	26 24 20	0,84 1,70 1,40	44 40 29	16,5 17,5 17,5	0 0,20 0,78	0 10 55	Frindel et al. 1967
Ehrlich- Carcinom i.m. (ECJ)	0,5 24 300 1000 3000	14 (14) 22 (35) 49 (124) 95 (630) 277 (1732)	57		100 87 57 45 30		0 (0) 0,30 (0,55) 0,58 (0,83) 0,75 (0,96) 0,89 (0,98)	0 53 80 95 97	Jenkinson et al. 1975
Ehrlich- Carcinom s.c. (ECL)	300 900 2400	82 204 492	27 22 20		44 37 32	16,5 17,8 18,3	1,37 1,43 1,38	62 81 91	Lala 1972
Sarkom 180	18 410 1250 3075 4310	12 29 55 108 144					0,39 0,41 0,43 0,45 0,53		Sommer 1976
Sarkom 180 (S 180)	407 575 1216	31 36 65	33 36 12		59 63 24	14,0 13,0 26,0	0,88 1,64	27 44	Simpson-Herren & Lloyd 1970
Sarkom 180	200 700 1500	26 43 100	44 Z 35 P 38 Z 29 P 37	1,50 1,10 1,30 1,00 1,50	72 54 74 58 69	14,0 14,5 14,5 14,0 13,5			Nishioka 1970
Sarkom 180	398 1209 2315		34 26 17	3,5 3,1 1,8	54 46 30	14,0 15,0 17,5	1,1 1,0 0,4		Henrichs 1979
Carcinom EMT 6/M/AC	1,5 4,5 19 175	32 42 63 120	32 29 25 24		68 57 52 52	14,1 14,2 15,7 18,5	1,49 1,52 1,57 1,67	40 48 59 74	Watson 1976
Adeno- carcinom 755 (AC 755)	46 378 2660 3630	19 38 9 9	27 18 9 9		51 45 28 14	12,0 14,0 16,0 24,0	0 0,82	0 31	Simpson-Herren & Lloyd 1970
Fortner- Plasmocytom (FP)	310 493 1990 2270 10700 13500	38 41 67 72 264 504	9 14 11 13 15 9		16 23 21 28 32 19	15,1 13,8 15,0 16,8 16,5 16,5	0 0 0,22 0,41 1,34 0,86	0 0 17 30 84 86	Simpson-Herren & Lloyd 1970
Rhabdomyosar- kom R-1 (R-1)	300 1500 Z 500 P 1000	60 144 9 14	20 12 9 14		42 29 27 30	20,4 25,5 25,5 18,5	0,58 0,79	34 62	Hermens & Barendsen 1969

Z = Zentral gelegene Tumorbezirke
P = Peripher gelegene Tumorbezirke
() = Werte in Klammern sind über den steigenden nekrotischen Anteil korrigiert

Tab. 2.2.3.: Zellkinetische Parameter verschiedener Experimentaltumoren

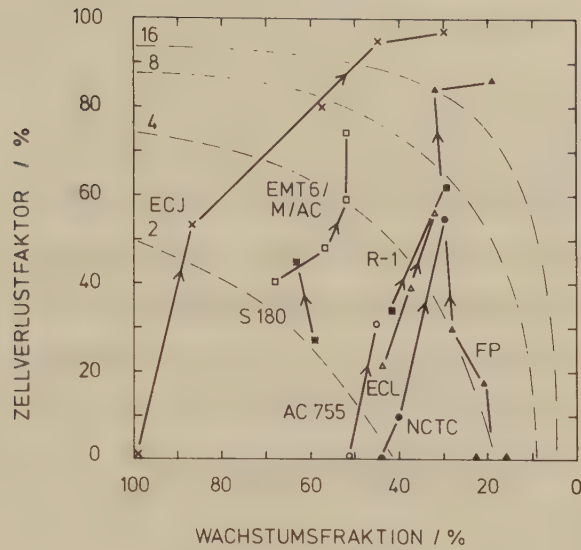


Abb. 2.2.3.: Im Verzögerungsdiagramm geben die unterbrochenen Linien das Verhältnis T_D/t_C mit konstanten Werten von 2,4,8 und 16 an (nach Steel, 1977). Die Abkürzungen der Tumorbezeichnungen sind in Tab. 2.2.3. erklärt.

2.2.4. Tumorkinetik und Vaskularisation

Die Bedeutung der Blutversorgung für das Wachstumsverhalten von Experimentaltumoren ergibt sich aus den Tatsachen, daß einerseits Zelltod neben anderen Faktoren durch Mangel an Nährstoffen hervorgerufen werden kann, andererseits aber die Beseitigung autolysierter Zellbestandteile und die Bereitstellung von Zellen zur Phagozytose abgestorbener Zellen von der Blutversorgung abhängt. Das mikroskopische Äquivalent des Zelltods ist die Zellnekrose. Die Zeichen einer Nekrose, wie Kernpyknose und Karyorrhexis können aber erst einige Zeit nach dem Tod erkannt werden (Bessis, 1964). Viele Experimentaltumoren besitzen nekrotische Gebiete, was darauf hinweist, daß ein Verlust lebensfähiger Zellen durch Zelltod stattfindet. Solange die Zelltodrate gegenüber der Beseitigungsrate abgestorbener Zellen überwiegt, nimmt der Anteil der nekrotischen Gebiete mit steigendem Tumolvolumen zu (Lala, 1972). Aus den abgestorbenen Zellen wird ein cytotoxisches Polypeptid freigesetzt, so daß sich die nekrotischen Areale zum Teil selbst perpetuieren (Sylvén & Holmberg, 1965). Die Distanz zwischen den Gefäßen und der Nekrose ist von Tumor zu Tumor unterschiedlich (Tab. 2.2.4.).

Die herausragende Bedeutung des Sauerstoffmangels für die Zellkinetik und Zelltod konnte von Tannock (1968, 1972) und Thomlinson & Gray (1956) demonstriert werden. Ihre berechneten maximalen Sauerstoffdiffusionsradien von 50 bis 230 μm stimmen gut mit den in Tabelle 2.2.4. angegebenen Entfernungen zur Nekrose überein. Unter hypoxischen Bedingungen reduzierte sich beim Mammacarcinom BICR/SA1 diese Distanz von 85 μm auf 75 μm (Tannock & Steel, 1970).

Autor	Tumor	Distanz Gefäß-Nekrose
Thomlinson & Gray 1956	menschl. Bronchialcarcinome	169 µm
Goldacre & Sylvén 1962	Transplantationstumoren	150 µm
Kligerman et al. 1962	Mammaadenocarcinom M2	70 µm
Kolstad 1964	menschl. Cervixcarcinome	175 µm
Tannock 1968	Mammaadenocarcinom BICR / SA 1	85 µm
Tannock 1970	C3H Mammacarcinom	100 µm
Brammer 1976	Walker-Carcinom 256	130 µm (8 Tage alter Tumor) 105 µm (12 Tage alter Tumor)

Tab. 2.2.4.: Entfernung zwischen Versorgungsgefäßen und nekrotischen Gebieten bei verschiedenen menschlichen und tierischen Tumoren

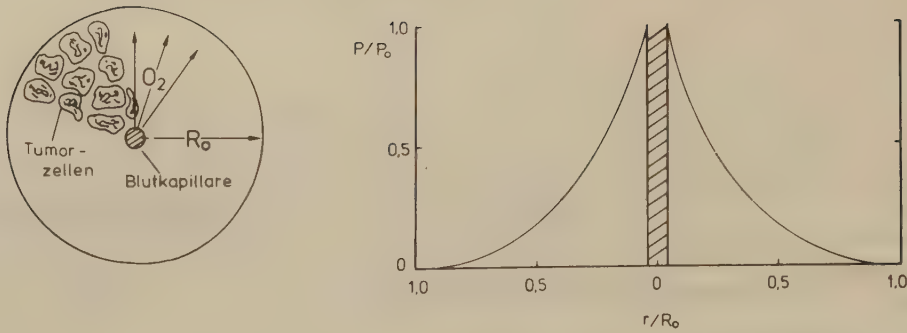


Abb. 2.2.4.a: Sie zeigt die Diffusion des Sauerstoffs vom Blutgefäß zur Peripherie eines Zylinders mit dem Radius R_0 und die Beziehung zwischen Sauerstoffpartialdruck P und radialer Entfernung zur Kapillare (nach Tannock, 1972).

Andererseits ist die Versorgung mit Sauerstoff auch für die Zellproliferation wichtig. Der Sauerstoffdruck fällt mit zunehmender Entfernung von Gefäßen stark ab (Abb. 2.2.4.a). Kapillarnähe Zellen besitzen einen höheren Markierungsindex und eine höhere Kornzahl/Zelle als kapillarferne Zellen (Bosiljanoff et al., 1977; Brammer, 1976; Kligerman et al., 1962; Lala, 1972; Tannock, 1968, 1970). Daß diese Beobachtung nicht auf mangelnde Verfügbarkeit von markierten DNA-Vorläufern beruht, läßt sich aus dem parallel abfallenden Mitoseindex ersehen; ebenso nimmt die Wachstumsfraktion mit zunehmender Distanz von der Kapillare ab (Abb. 2.2.4.b.). Johnson und Bond (1961) konnten in in-vitro Versuchen die Eindringtiefe von ^3H -TdR in solide Tumorstücke unter Beatmung mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid von 100 μm auf 200 μm erhöhen. Wenn das

Zeitintervall zwischen Markierung und Töten der Tiere verlängert wird, kann man beobachten, daß markierte Zellen von ihrem Versorgungsgefäß infolge der Teilung der Zellen nach außen weggedrückt werden, sich nekrotischen Gebieten nähern und in sie eingeschlossen werden (Bosiljanoff et al., 1977; Szczepanski & Trott, 1975; Tannock, 1968).

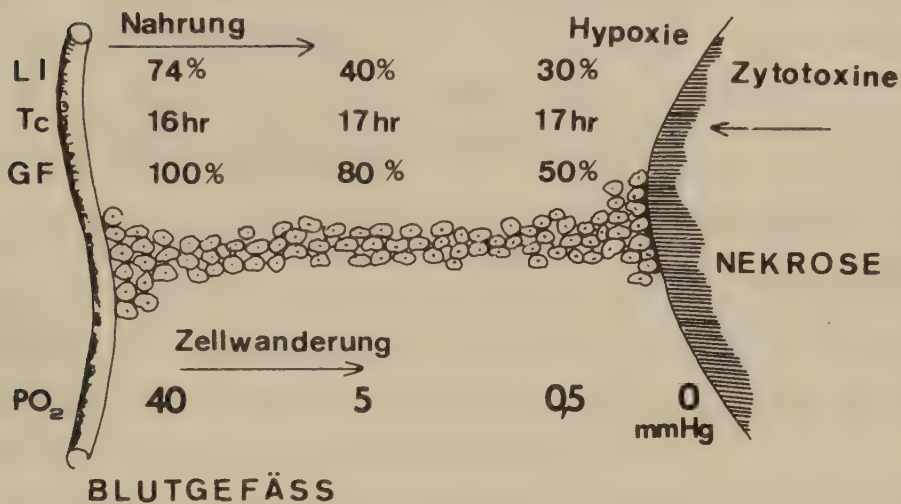


Abb. 2.2.4.b: Abhängigkeit der zellkinetischen Parameter von der Sauerstoffversorgung (nach Tannock, 1968).

Tannock (1968) untersuchte auch die Zellzykluszeiten in verschiedenen Abständen von Kapillaren und fand, daß der erste Gipfel und der Beginn des zweiten Anstiegs der PLM-Kurven eine konstante Form zeigen. Mit zytochemischen Methoden wiesen Caspersson und Santesson (1942) nach, daß in der Tumorperipherie und um Gefäße ein Zelltyp "A" vorkommt, der sich durch eine hohe zytoplasmatische Konzentration an Proteinen und RNA und eine starke Anhäufung von DNA im Kern auszeichnet. Im Gegensatz dazu enthält das

Zytoplasma des Zelltyps "B", der sich in der Nähe von nekrotischen Arealen befindet, nur geringe Mengen an Proteinen und RNA. Zwischen beiden extremen Zelltypen bestehen fließende Übergänge.

Untersuchungen über den Zusammenhang von Zellproliferation und makroskopischer Tumorstruktur haben gezeigt, daß der Markierungsindex, der Mitoseindex und die "growth fraction" zum Tumorzentrum hin abnehmen (Hermens & Barendsen, 1969; Jenkinson et al., 1975; Nishioka, 1970). Dahingegen liegen über das Verhalten der Zellzykluszeit widersprüchliche Angaben vor. Während die intermitotische Zeit beim Rhabdomyosarkom R-1 im Zentrum 25,5 h und in der Peripherie 18,5 h betrug, fand Nishioka einen solchen Unterschied beim Sarkom 180 nicht (Tab. 2.2.3.).

3. Material und Methode

- 3.1. Versuchstiere und ihre Haltung
- 3.2. Tumor und Tumorimplantation
- 3.3. Tumolvolumenmessung
- 3.4. Das Thymidinanalogon Joddesoxyuridin (J-UdR)
 - 3.4.1. Physikalische Eigenschaften der Jodisotope
 - 3.4.2. Biochemie und Kinetik des J-UdR-Einbaus
- 3.5. Tumormeßplatz
- 3.6. Bestimmung der Aktivitätsverlustrate
- 3.7. Ganzkörperzähler
- 3.8. Messung des nekrotischen Anteils
- 3.9. Herstellung toter markierter Zellen

3.1. Versuchstiere und ihre Haltung

Für die Experimente wurden 8 bis 12 Wochen alte, ungefähr 25-30 g schwere männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57 BL/6J Han verwendet. Bei einem Inzuchtstamm sind mindestens 99 Prozent der 50.000 bis 100.000 Genpaare homozygot (JAX Notes, 1976).

Little paarte 1921 ein heterozygotes Paar (φ 57 x σ 52) aus Lathrops Zucht. Daraus entwickelten sich die Stämme C57 BL (schwarzes Fell, Farbgene aaBBCCDD) und C57 BR (braunes Fell, Farbgene aabbCCDD). Vor 1937 wurde der Stamm C57 BL in die Unterlinien C57 BL/6 und C57 BL/10 aufgetrennt (Abb. 3.1.). C57 BL/6 gelangte über Fekete und Hall 1948 zum Jackson Laboratorium (Graff & Snell, 1969a; Green, 1975; Zentralinstitut für Versuchstierzucht (ZfV), 1974). Zur Zeit befinden sich die C57 BL/6J Han Mäuse in der zweiten Rückkreuzungsgeneration (ZfV, 1974), ihre mittlere Lebensdauer beträgt 684 Tage (Green, 1975).

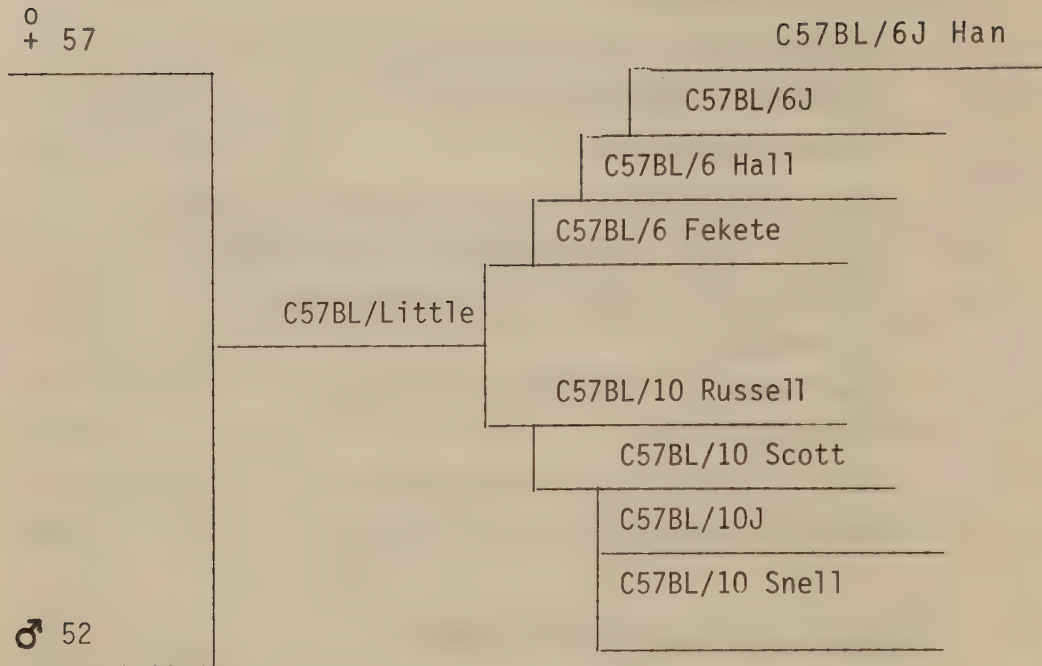


Abb. 3.1.: Stammbaum des Stammes C57/BL 6J (modifiziert nach Graff & Snell, 1969a).

Die Histokompatibilitätsgene des Stammes C57 BL/6J, die wichtig für die Tumor-Wirt-Beziehung sind (Forman et al., 1972; Fortner et al., 1975; Graff et al., 1971; Snell et al., 1953) können aus der folgenden Tabelle entnommen werden (Graff & Snell, 1969a, 1969b; Green, 1966, 1975; Snell et al., 1953).

Tabelle 3.1.: Histokompatibilitätsgene des Stammes C57 BL/6J

Genlocus													
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
Allel	c	b	a	a	-	-	a	a	weder a noch b	-	-	a	a

Die Mäuse wurden zu fünft in Plastik Käfigen gehalten, die oben durch ein Metallgitter verschlossen waren. Als Spreu dienten autoklavierte Hobelspäne, die während der Versuche, bei denen die Mäuse mit radioaktiven Verbindungen markiert worden waren, 1 bis 2 mal pro Tag ausgewechselt wurden, um eine Kontamination der Versuchstiere durch radioaktiven Urin und Kot so weit wie möglich zu verhindern (Pittner, 1971). Die Tiere erhielten Leitungswasser und das Trockenfutter "Herlan R/M 204" ad libitum. 2 - 3 Tage vor Versuchsbeginn und während der Experimente wurde das Leitungswasser durch eine 0,1% Natriumjodidlösung ersetzt, um eine Anreicherung radioaktiven Jodids in der Schilddrüse zu verhindern und die körpereigenen Verteilungsräume abzusättigen (Hofer et al., 1969; Hughes et al., 1964). Die Temperatur im Tierstall betrug 24° C. Ein Tag-Nacht-Rythmus im 12-stündigen Wechsel wurde durch eine Zeituhr simuliert, die mit der Lichtanlage verbunden war.

3.2. Tumor und Tumorimplantation

Die Versuche wurden mit dem Mammaadenocarcinom EO 771 durchgeführt. Es handelt sich um einen solide wachsenden Tumor, der bisher nicht in der Ascitesform gehalten werden konnte (Klein, 1951). Dieser Experimentaltumor entstand 1939 oder 1940 in der Brustdrüse einer C57 BL/6J Maus des Roscoe B. Jackson Laboratoriums (Dunham & Stewart, 1953; Klein, 1951; Snell et al., 1948; Sugiura & Stock, 1952); somit liegt bei dem System C57 BL/6J/EO 771 eine syngene Tumor-Wirt-Beziehung vor (Snell et al., 1953).

Metastasen konnten bei der Inspektion obduzierter Mäuse, die Tumoren verschiedenen Alters trugen, nicht entdeckt werden. Auch Dunham & Stewart berichteten 1953, daß dieser Tumor nur vereinzelt und selten metastasiert.

Im Tumorgewebe lassen sich hämorrhagische Bezirke erkennen, die mit wachsendem Tumolvolumen an Ausdehnung zunehmen. Parallel dazu entwickelt sich am Fuß des tumortragenden Hinterbeins der Mäuse im steigenden Maße ein lokales Ödem. 13 Tage nach der Transplantation ($V = 5300 \text{ mm}^3$) weisen 4,5% der Versuchstiere keine, 43,9% eine leichte, 28,8% eine mittlere und 22,7% eine schwere ödematöse Schwellung auf ($n = 66$). Der Schweregrad des Ödems wurde aus dem Umfang des Fußes und aus der Zeit bestimmt, die eine durch Druck hervorgerufene Gewebedelle benötigt, um wieder zu verstreichen. Außerdem entsteht öfters ein Gangrän des Fußes. Tiere, die ein Gangrän aufwiesen oder deren Tumoren Ulcerationen zeigten, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

Nach Klein (1951) handelt es sich beim Carcinom EO 771 um einen zellreichen, medullären Tumor; Sugiura & Stock (1952) beschreiben lichtmikroskopisch beobachtete Inseln abgerundeter und polyhedraler Zellen, die ab und zu als schwach ausgebildete Drüsen zusammenliegen. Bei den jetzt durchgeführten Untersuchungen zeigt das Carcinom EO 771 keine adenoiden Strukturen. Der recht monomorphe Tumor erscheint in zwei Hauptformen: als vitaler und als pyknotischer Anteil. Die mittelgroßen vitalen Tumorzellen besitzen mäßig anisometrische, relativ helle Kerne mit auffallend großen und vermehrten Nukleolen und ein schmales, zart eosinophiles Zytoplasma. Die pyknotischen Zellen enthalten einen dunklen Zellkern und einen schmalen, intensiv eosinophil gefärbten Zytoplasmasaum. Nur selten zeigen die abgestorbenen Zellen eine völlige Auflösung des Zellkerns. Im pyknotischen Anteil kommen Hämorrhagien vor. Die Lymphspalten sind prall mit eiweißhaltiger Flüssigkeit gefüllt und manchmal mit Erythrozyten durchsetzt.

König (1978) ermittelte für einen sieben Tage alten Tumor ($V = 800 \text{ mm}^3$) eine Wachstumsfraction von 0,9 und eine Zellzykluszeit von ungefähr 19 Stunden, davon entfallen 8,5 Stunden auf die G_1 -Phase, 8,2 Stunden auf die S-Phase und 2,3 Stunden auf die G_2 -Phase und die Mitose. Cytophotometrische Messungen über die Verteilung der Zellen im Zellzyklus ergaben, daß sich 52% in der G_1 -Phase, 33% in der S-Phase und 15% in der G_2 - und Mitosephase befinden.

Das Mammaadenocarcinom kann als Zellsuspension in einer 10% DMSO-Lösung in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren werden; während dieses Vorgangs nimmt die Temperatur um 1° bis 2°C pro Minute ab. Die eingefrorenen Zellen werden im Wasserbad bei 37°C

aufgetaut. Das Einfrieren vermindert die Lebensfähigkeit der Tumorzellen nicht; wenn die Zellen 15 Monate nach dem Einfrieren implantiert werden, beträgt die Tumorangehrate 100 Prozent; ebensowenig wird dadurch die Chemosensitivität des Carcinoms beeinflusst (Sugiura, 1961; Sugiura et al., 1968).

Der Tumor besitzt ein übertragbares, virusähnliches Agens, das hitzelabil ist und dessen Molekulargewicht unter 20.000 liegt. Es verursacht bei Tumorträgern einen hundertfachen Anstieg der Lactatdehydrogenase, eine Anämie und eine verstärkte anaerobe und aerobe Glykolyse (Manso et al., 1958; Riley, 1963; Riley et al., 1963).

Das Wachstumsverhalten dieses strahlenresistenten Adenocarcinoms nach Chemo-, Radio- und kombinierter Therapie ist gut untersucht worden. (Balis, 1960; Balis & Salser, 1964; Gelzer & Loustalot, 1967; Heitmann, 1977; Kidder et al., 1949; Konietzny, 1977; Kuehne et al., 1962; Porschen et al., 1979a; Shohat et al., 1965; 1975; Sugiura & Stock, 1952; Sugiura et al., 1958; Sugiura, 1962).

Um Tumorzellen zur Implantation zu gewinnen, wurden eine Woche alte Tumoren getöteten Tieren steril entnommen, von Fett und Knochen befreit, mit einem Pistill zermörsert und die Tumorzellen aus dem Gewebebrei mit Hilfe eines feinmaschigen Metallsiebes abfiltriert. Zu 0,1 ml der Tumoreinzelzellsuspension wurden 0,1 ml einer 0,1% Erythrosin B-Lösung hinzugefügt, um festzustellen, wieviel Tumorzellen lebensfähig sind (Giesen, 1970; Steel, 1977; Vaage, 1972). Während tote Zellen infolge von Membrandefekten angefärbt werden, nehmen intakte Zellen den Farbstoff nicht auf ("dye - exclusion - test"). Die Anzahl der lebenden Tumorzellen wurde in der Buerker-Kammer bestimmt, ihr Anteil an der Gesamttumorzellzahl betrug im Mittel 50 Prozent.

Für die Versuche wurden den Tieren ca. 175.000 lebende Zellen/ 0,3 ml isotonischer Kochsalzlösung intramuskulär in das rechte Hinterbein gespritzt. Die Injektion erfolgte mit einer sterilen Tuberkulinspritze und einer dünnen Nadel ($27 \times \frac{1}{2}$).

Um die Sterilitätsbedingungen während des Vorgehens zu überprüfen, wurden einige Tropfen der endgültigen Tumorverdünnung auf einen Standard-I-Nähragar gegeben und mehrere Tage im Brutschrank bei 37° Celsius aufbewahrt. Dadurch konnte gezeigt werden, daß bei keinem Experiment die injizierte Tumorzellsuspension bakteriell verseucht war.

3.3. Tumervolumenmessung

In Abständen von 1 bis 2 Tagen wurde mit einer Schublehre der größte Durchmesser D des Tumors in einer Ebene bestimmt, die einen Winkel von 90 Grad mit dem Femur bildete. Die Messungen während eines Versuchs wurden immer von derselben Person ausgeführt, um den subjektiven Fehler klein zu halten. Da die Form des Tumors annähernd kugelförmig ist, läßt sich das Volumen nach folgender Beziehung abschätzen (Blum, 1943; Porschen & Feinendegen, 1969)

$$\begin{aligned} V_{Tu} &= \frac{4}{3} \pi r^3 && - V_{\text{gesundes Bein}} \\ &= \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D}{2}\right)^3 && - V_{\text{gesundes Bein}} \\ &= 0,52 D^3 && - V_{\text{gesundes Bein}} \end{aligned} \quad (17)$$

Die Korrektur für das gesunde Bein, die je nach Alter der Tiere 45-72 mm³ betrug, wurde eingeführt, weil auf histologischen Schnitten zu erkennen ist, daß zu Beginn des Tumorstadiums der überwiegende Teil des tumortragenden Beins aus Muskulatur besteht.

Um zu überprüfen, ob durch diese Abschätzung das tatsächliche Tumervolumen erfaßt wird, wurde das berechnete Tumervolumen mit der gewogenen Tumormasse verglichen (Abb. 3.3.a).

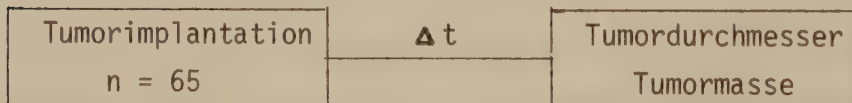


Abb. 3.3.a: Versuchsablauf

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Implantation wurde der Tumordurchmesser mit der Schublehre bestimmt. Gleichzeitig wurden pro Meßpunkt 4 Mäuse mit einem mittleren Tumordurchmesser getötet und die gesunden und die tumortragenden Beine

ohne Fell gewogen. Die Tumormasse ergab sich aus der Subtraktion der Masse des gesunden Beins von der der tumortragenden Extremität. Abb. 3.3.b. zeigt die Beziehung zwischen der Masse und dem berechneten Volumen; das angenommene spezifische Gewicht des Tumorgewebes betrug 1. Da die Masse oberhalb eines Volumens von 500 mm^3 um einen Faktor 1,91 größer ist als das berechnete Volumen, verändert sich die Beziehung zwischen Tumorumfang und Durchmesser folgendermaßen, um das tatsächliche Volumen zu erhalten:

$$\begin{aligned} V_{\text{TU}} &= (0,52 D^3 - V_{\text{gesundes Bein}}) \cdot 1,91 & (18) \\ &= D^3 - 1,91 \cdot V_{\text{gesundes Bein}} \end{aligned}$$

Das Volumen kleinerer Tumoren kann aus der Kalibrationskurve entnommen werden. Es muß aber betont werden, daß in diesem Volumenbereich der Meßfehler groß ist.

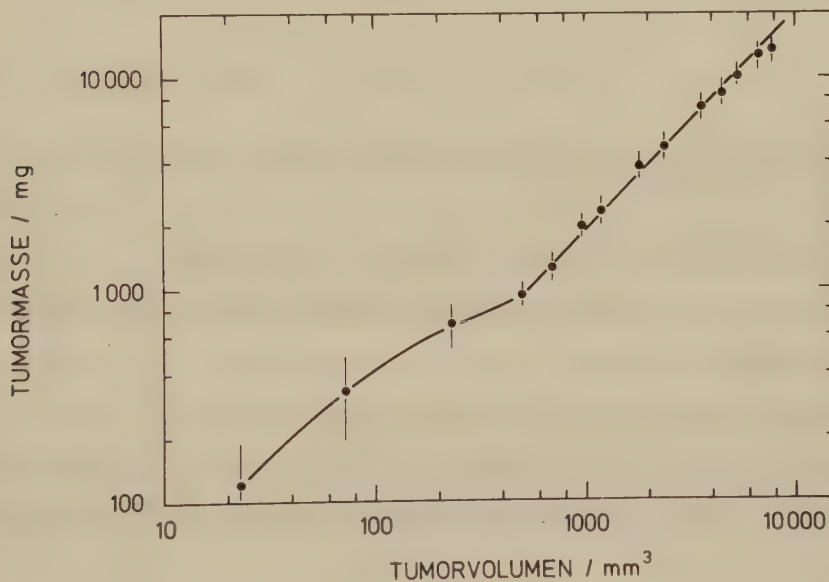


Abb. 3.3.b: Beziehung zwischen dem berechneten Tumorumfang und der gewogenen Tumormasse

3.4. Das Thymidinanalogon Joddesoxyuridin (J -UdR)

Das Nukleosid 5-Jod-2'-Desoxyuridin besitzt anstelle der Methylgruppe des Thymidins ($r=2,0 \text{ \AA}$) in Position 5 des Pyrimidinringes ein Jodatom ($r=2,15 \text{ \AA}$) (Abb. 3.4.).

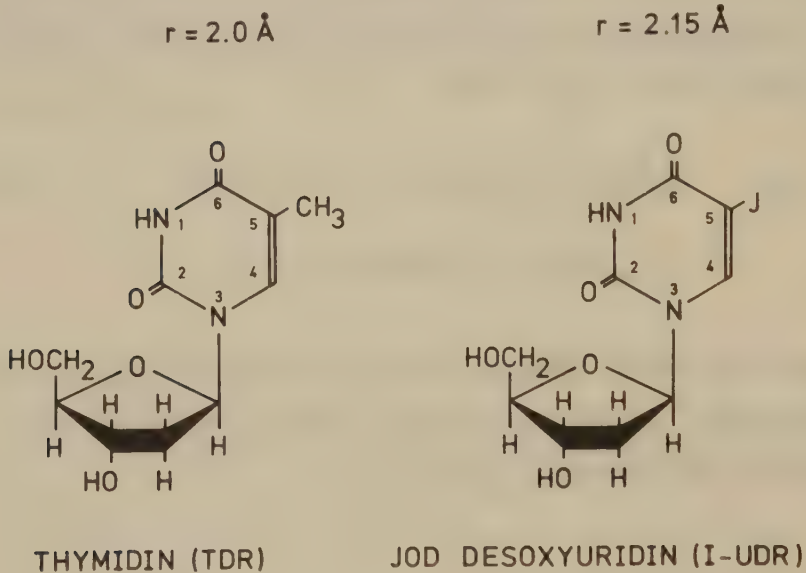


Abb. 3.4.: Strukturformel von Thymidin (TdR) und Joddesoxyuridin

3.4.1. Physikalische Eigenschaften der Jodisotope

J -UdR kann mit den radioaktiven Isotopen Jod-125 oder Jod-131 markiert werden.

Jod-125 zerfällt in zwei Schritten (Abb. 3.4.1.a):

- 1) durch Elektron-Einfang (80% K, 20% L-Einfang) entsteht nach einer Halbwertszeit von 60 Tagen ein metastabiler Zustand des Tellur-125
- 2) dieser geht durch innere Konversion (93%) oder Emission einer 35,4 KeV Gammastrahlung (7%) mit einer Halbwertszeit

von $1,6 \cdot 10^{-9}$ sec in das stabile 125-Tellur über. (Ertl et al., 1970; Ertl, 1970; Feinendegen et al., 1971; Feinendegen, 1977).

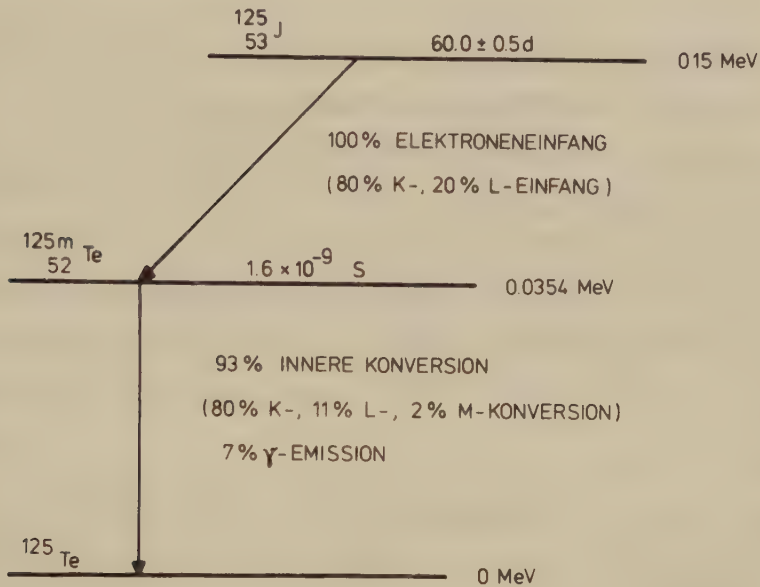


Abb. 3.4.1.a: Zerfallsschema von Jod-125

Die Radiotoxizität von Jod-125 in biologischen Systemen ist höher, als es auf der Basis der absorbierten Dosis vorausgesagt werden kann. Dies ist bedingt durch "Molekülexplosionen", die als Folge des Auger-Effektes auftreten.

Die Lücken, die in den inneren Schalen durch Elektroneneinfang von Seiten des instabilen Kerns entstehen, werden durch Elektronen äußerer Orbitale aufgefüllt. Die Energiedifferenz geht entweder durch Röntgenstrahlung oder durch Emission schwächer gebundener Elektronen ("Auger-Elektronen") verloren. Das stabile Telluratombesitzt als Folge des Elektronenverlustes eine positive Ladung, die von +1 bis +18 reicht.

In einem Molekül zieht es Elektronen anderer Atome an sich, so daß die entstehende Verteilung positiver Ladungen zu einer Zerreißung des ganzen Moleküls führen kann (Ertl et al., 1970; Ertl, 1970; Feinendegen et al., 1971; Hofer & Hughes, 1971).

Mit einer Halbwertszeit von 8,05 Tagen zerfällt Jod-131 durch β^- -Zerfall zuerst in metastabile Zustände des Xenons-131 und dann unter Emission von Gamma-Strahlung verschiedener Energien in den Grundzustand des Xenons-131 (Abb. 3.4.1.b). 82% dieser Strahlungsart besitzen eine Energie von 364 KeV. Die Radiotoxizität von Jod-131 ist um einen Faktor 4 bis 5 kleiner als die von Jod-125 (Hofer & Hughes, 1971).

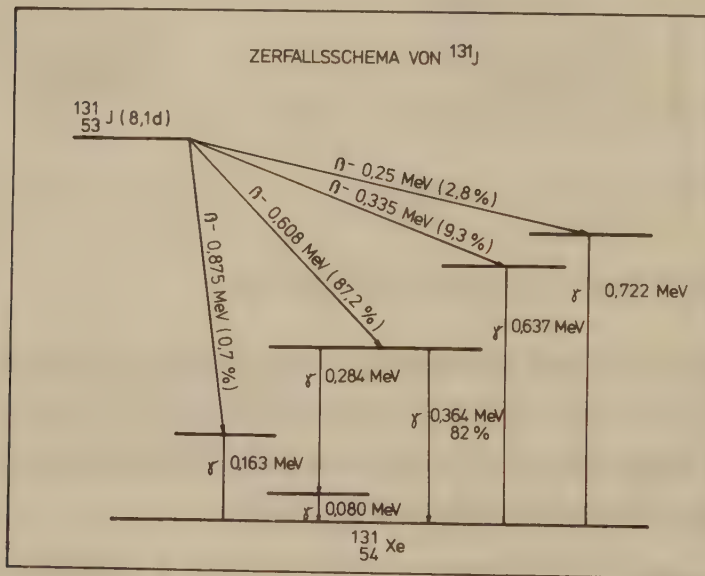


Abb. 3.4.1.b: Zerfallsschema von Jod-131

3.4.2. Biochemie und Kinetik des J-UdR-Einbaus

Nach intraperitonealer Injektion geht markiertes J-UdR zum größten Teil in den Blutstrom über, ein gewisser Anteil kann aber auch von den Zellen des Bauchraumes verwertet werden oder über den Stichkanal wieder nach außen gelangen (Quastler, 1963; Abb. 3.4.2.). 20 bis 30 Minuten nach i.p. Injektion von ^{125}J -UdR ist ein konstanter Blutspiegel der ^{125}J -Aktivität erreicht, der mindestens bis zu 1 Stunde nach Injektion bestehen bleibt (Johanson, 1972). J-UdR und seine Kataboliten verteilen sich innerhalb von Sekunden im Extrazellulärraum (Begg, 1975; Hughes et al., 1964). Organe, die sich in der Nähe oder innerhalb der Bauchhöhle befinden, werden in höherem Maße als bei intravenöser oder subcutaner Gabe markiert (Hofer & Hughes, 1970).

Der J-UdR-Katabolismus findet hauptsächlich in der Leber statt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt scheint die Aufspaltung des Nukleosids in Joduracil (JU) und Desoxyribose zu sein, die mit einer Halbwertszeit von 3 min abläuft. (Hughes et al., 1964; Prusoff et al., 1960). Die Deiodination beginnt mit der Reduktion zu 5,6-Dihydro-Joduracil, was zu einem spontanen Verlust des Jodids führt (Johanson, 1972; Prusoff et al., 1960). Nicht inkorporiertes markiertes J-UdR und seine Abbauprodukte werden mit einer Halbwertszeit von ungefähr 45 Minuten über die Niere ausgeschieden, die Exkretion ist nach 24 Stunden beendet. Ein geringer Teil verbleibt jedoch im Jodidpool des Körpers (Hughes et al., 1964; Prusoff et al., 1960).

Aus dem interstitiellen Raum gelangen Nukleoside durch Diffusion oder aktiven Transport in das Zytoplasma und den Kern der Zellen (Feinendegen, 1977). Da die von der Waal'schen Radien der Methylgruppe des Thymidins und des Jodatoms gut übereinstimmen, hemmt J-UdR die Thymidinaufnahme für die DNA-Synthese kompetitiv und wird mit einer Halbwertszeit von 5 Minuten spezifisch in die DNA solcher Zellen eingebaut, die sich zum Zeitpunkt der Injektion in

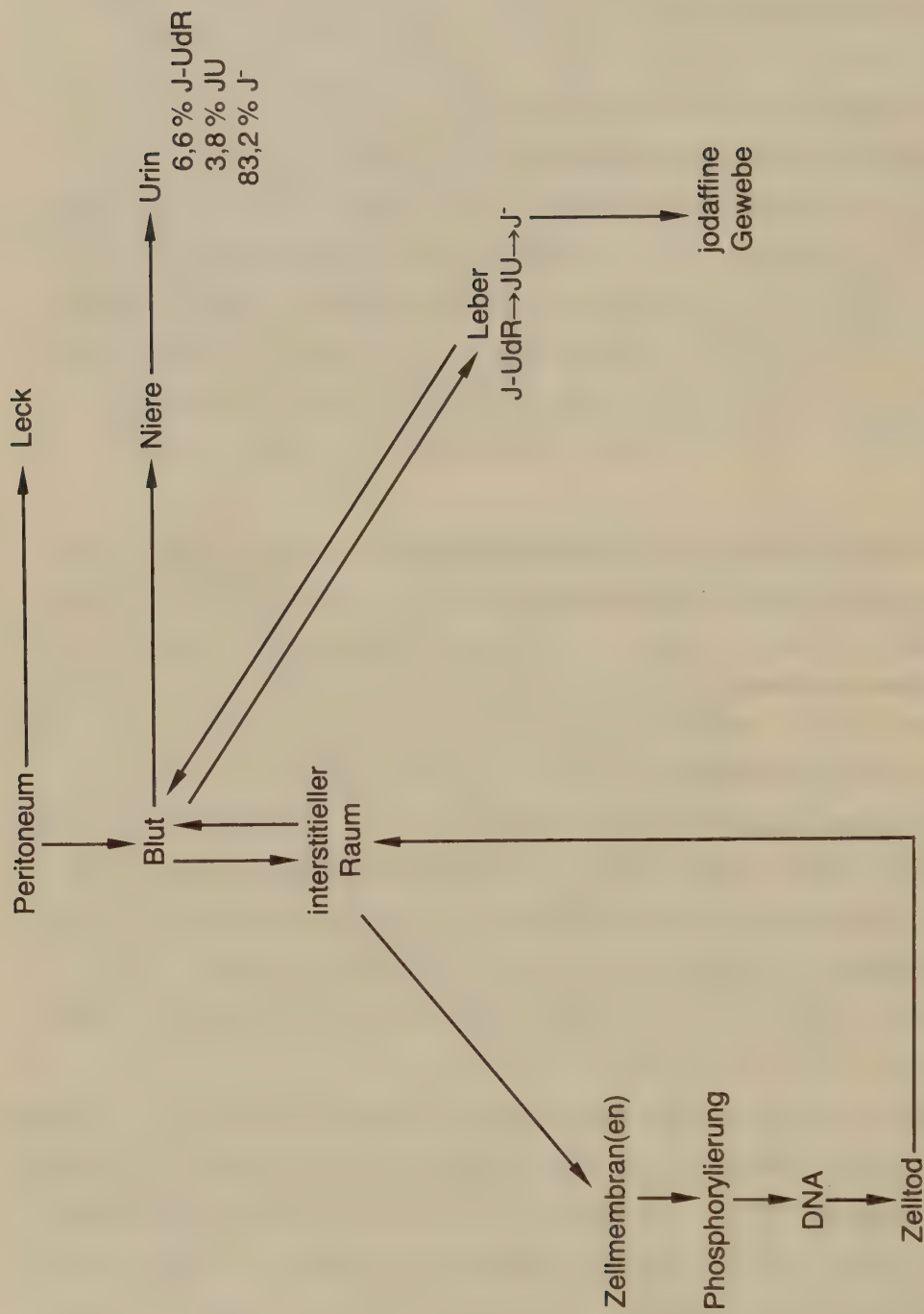


Abb. 3.4.2.: Wege von Joddesoxyuridin und seiner Kataboliten nach intraperitonealer Injektion, Erläuterungen s. Text

der S-Phase befinden. (Hughes et al., 1964; Mak & Till, 1963; Prusoff, 1959a, 1959b, 1960).

Eine halbe Stunde nach Injektion ist die Inkorporation beendet (Hughes et al., 1964; Johanson, 1972; Mendelsohn, 1965). Zwischen 5 und 10 Prozent der injizierten Menge werden in die Organe von Mäusen eingebaut (Hughes et al., 1964; Hofer & Hughes, 1970). Der effektivere Einbau von Thymidin kann zum einen durch den schnelleren Abbau des J-UdR's in der Leber, zum anderen durch die Diskriminierung gegenüber J-UdR von Seiten der Thymidylatkinase erklärt werden (Baugnet-Mahieu & Goutier, 1968; Feinendegen et al., 1966a, 1973; Hughes et al., 1964). Daraus folgt auch, daß die Wiederverwertung des Joddesoxyuridins normalerweise nur in geringem Maße stattfindet (Commerford, 1965). Die Einbaurate des J-UdR's in verschiedenen Geweben läßt Rückschlüsse auf ihren Proliferationsstatus zu (Feinendegen et al., 1973).

Das in die DNA eingebaute Thymidinanalogon geht nur bei Zelltod verloren. Auch eine Entfernung des Tracers aus der DNA lebender Zellen durch Deiodination oder Austausch mit Thymidin konnte nicht beobachtet werden (Commerford, 1965; Feinendegen et al., 1966a, 1966b).

J-UdR per se ist toxisch (Dethlefsen, 1974; Post & Hoffman, 1969). Die LD_{50} nach einmaliger intraperitonealer Injektion beträgt 2,5 g/kg, nach täglicher Gabe über einen Zeitraum von 13 Tagen 318 mg/kg Körpergewicht (Prusoff et al., 1960). Deshalb ist es auch in der Lage, das Wachstum von Tumoren zu hemmen (Prusoff, 1959a). Dieser Nachteil kann durch Radiotracerdosen mit hoher spezifischer Aktivität eliminiert werden (Feinendegen, 1977). Wenn nicht anders angegeben, betrug sie für 125-Joddesoxyuridin ungefähr 1800 Ci/mMol, für 131-Joddesoxyuridin 2,13 Ci/mMol.

Die biologische Stabilität, die befriedigende Energie der Gammastrahlung und die geringe Wiederverwertung lassen Joddesoxyuridin, das mit Jod-125 oder -131 markiert ist, als geeigneten Tracer für

die nicht-invasive, externe Langzeitmessung des natürlichen und des therapieinduzierten Zellverlusts in Tumoren erscheinen.

3.5. Tumormeißplatz

Die Aktivität des tumortragenden und des gesunden Beins der Mäuse nach Injektion markierten Joddesoxyuridins wurde nach der Methode von Porschen und Feinendegen (1969) gemessen (Abb. 3.5.a).

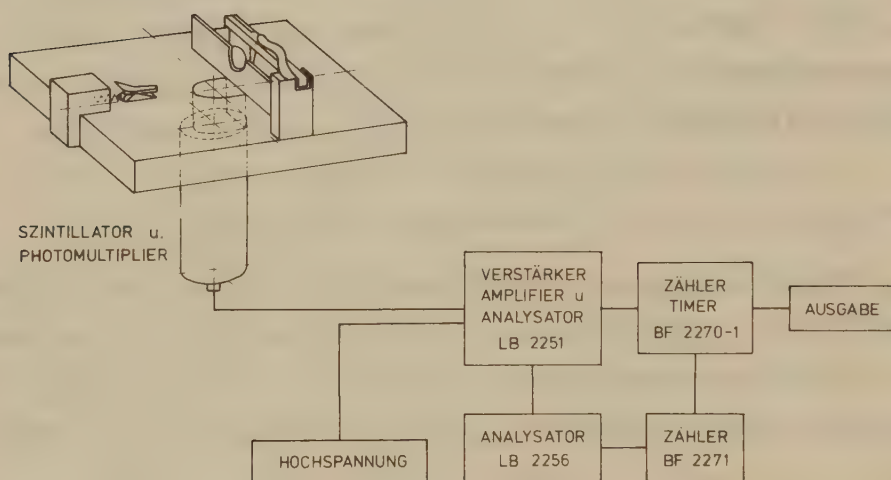


Abb. 3.5.a: Meßanordnung des Tumormeißplatzes

Die Mäuse befanden sich während des Meßvorgangs in Polyäthylenröhrchen. Die hervorstehende Extremität wurde über eine Öffnung in der Mitte einer Bleiplatte gelegt, unter der sich ein Natriumjodidszintillationszähler befand. Das tumortragende oder gesunde Bein wurde am Fuß mit der Hand des Untersuchers und am proximalen Ende durch einen Bleisteg mit einem schwenkbaren Gegenstück fixiert. Durch diesen Steg konnte auch die Körperstreustrahlung in ausreichendem Maße abgeschirmt werden. (Pittner, 1971). Um eine

eventuelle Kontamination des Meßplatzes zu verhindern, wurde die Bleiplatte mit einer Plastikfolie bedeckt. Der statistische Meßfehler bei wiederholtem Einlegen der Maus betrug 5 Prozent (Porschen & Feinendegen, 1969). Die Tiere wurden normalerweise 1 Minute lang gemessen; sank jedoch die Zählrate unter 1000 cpm ab, wurde die Meßdauer auf 2-3 Minuten erhöht.

Die Isotope ^{125}J und ^{131}J können nach linearer Verstärkung aufgrund ihrer unterschiedlichen Energie in einem 2-Kanalimpulshöhenanalysator aufgetrennt werden.

Bei einer Empfindlichkeit des ^{125}J -Kanals von 4,1% betrug der Nulleffekt 50 bis 200 cpm. Die Zählrate war bis zu $5 \cdot 10^5$ cpm der gemessenen Aktivität proportional (Abb. 3.5.b). Die Konstanz der Meßanordnung wurde mit einem Standard überwacht.

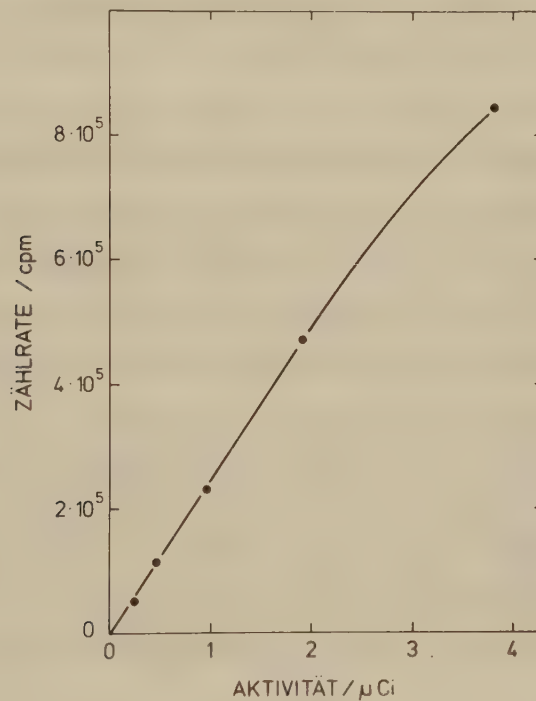


Abb. 3.5.b: Zählverlust-Korrektur-Kurve des Tumormeßplatzes

3.6. Bestimmung der Aktivitätsverlustrate

Die gemessenen Zählraten der tumortragenden bzw. der gesunden Mäusebeine wurden im halblogarithmischen Maßstab als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Zur Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen einer Versuchsgruppe wurden nur die Tiere herangezogen, deren Aktivitätsverlustraten das Chauvenet-Kriterium erfüllten (Jarrett, 1946). Die Mittelwerte der Rohdaten wurden folgendermaßen korrigiert:

- 1) Der durch kosmische Strahlung und Kontamination verursachte Nulleffekt wurde subtrahiert.
- 2) Bei einer Doppelmarkierung muß der Anteil des ^{131}J ods, der im ^{125}J od-Kanal mitgezählt wird, berücksichtigt werden. Er betrug 16,37 Prozent.
- 3) Um die absoluten Zählraten der einzelnen Versuchsgruppen miteinander vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte auf eine gleiche Ganzkörperaktivität nach J-UdR-Injektion bezogen.
- 4) Korrektur des radioaktiven Zerfalls der Jodisotope.
- 5) Während des Beobachtungszeitraumes wächst der Tumor weiter. Zur Bestimmung der Volumen-Korrekturfaktoren wurden Glaskolben mit einem Durchmesser von 6,2 bis 23 mm mit $0,19\text{ }\mu\text{Ci }^{125}\text{J-UdR}/0,05\text{ ml}$ Kochsalzlösung gefüllt und ihre Zählraten im Ganzkörperzähler bestimmt. Nachdem sie mit NaCl-Lösung aufgefüllt und am Tumormeißplatz ausgemessen worden waren, wurde der Quotient Zählrate am Tumormeißplatz/Zählrate am Ganzkörperzähler über dem Durchmesser aufgetragen (Abb. 3.6.a). Die Mittelwerte jeder Versuchsgruppe wurden durch die Korrekturfaktoren für die jeweiligen Volumina dividiert.

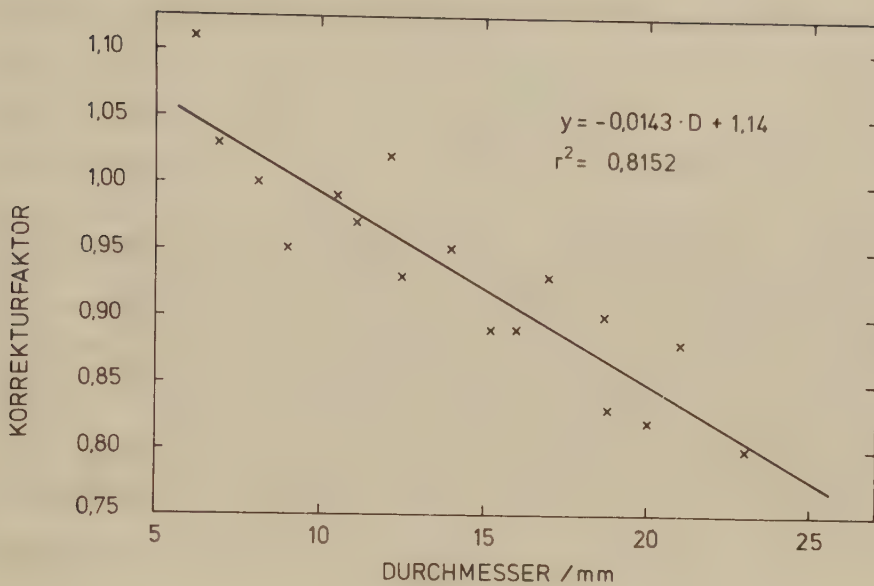


Abb. 3.6.a: Volumen-Korrektur-Kurve

Die Zählraten der gesunden Beine als Korrektur für die Hautaktivität wurden nicht von denen der tumortragenden Beine abgezogen, da sich die dadurch bedingte Veränderung der Aktivitätsverlustrate von -12,5 bis +5,8 Prozent innerhalb ihrer Standardabweichung befand. Die Hautaktivität über dem Tumor besaß ungefähr die gleiche Zählrate wie das gesunde Bein eines Tumorträgers.

In der halblogarithmischen Darstellung lassen sich im Bereich von 50-175 h und 175-300 h nach Injektion zwei Geraden mit unterschiedlichen Neigungen erkennen (Abb. 3.6.b). Somit wird die Abnahme der Tumoraktivität A in beiden Zeitintervallen durch ein Exponentialgesetz beschrieben:

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-\lambda_L \cdot t} \quad (19)$$

Aus der Halbwertszeit des Aktivitätsverlustes kann die Aktivitätsverlustrate λ_L berechnet werden:

$$\lambda_L = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

Da der Aktivitätsverlust von Mammatumoren kurz nach Injektion beginnt (Dethlefsen 1969, 1971), kann die zum Zeitpunkt $t = 0h$ im tumortragenden (A_{OTB}) und im gesunden Bein (A_{OGB}) eingebaute Aktivität durch Extrapolation der ersten Gerade auf die Ordinate bestimmt werden. Die im Tumor eingebaute Aktivität (A_{OTU}) kann durch die Subtraktion der Anfangsaktivitäten ermittelt werden:

$$A_{OTU} = A_{OTB} - A_{OGB} \quad (20)$$

Solange nichts anderes erwähnt ist, umfaßte jede Versuchsgruppe 20 Tiere. Die Gesamtzahl der untersuchten Tiere belief sich auf ungefähr 2000.

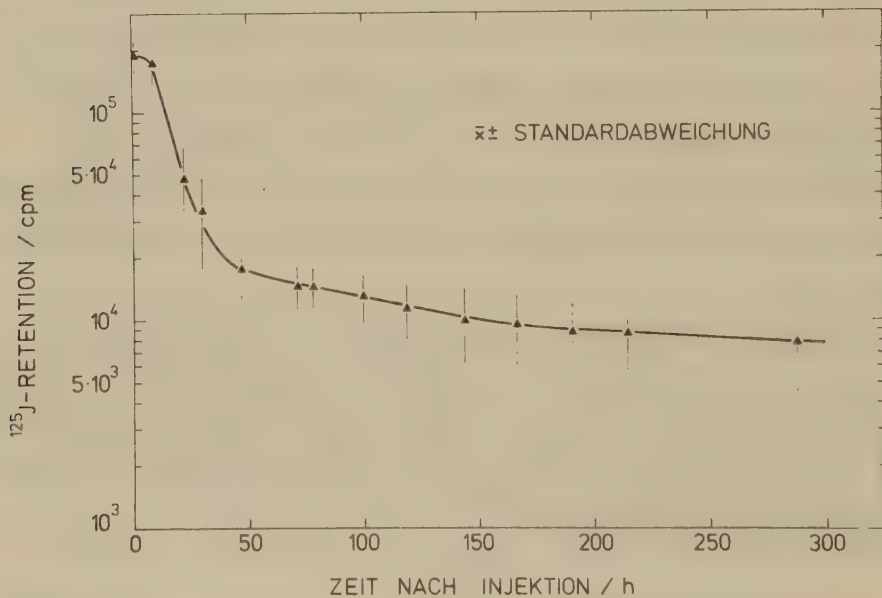


Abb. 3.6.b: Halblogarithmische Darstellung der Zählrate des tumortragenden Beins als Funktion der Zeit nach Injektion

3.7. Ganzkörperzähler

Die Aktivität der Versuchstiere wurde in einem speziell dafür entwickelten Ganzkörperzähler gemessen. Während des Meßvorgangs befand sich die in einem Kunststoffröhrchen fixierte Maus auf einem Plastikgestell zwischen zwei sich gegenüberliegenden NaJ-Szintillationsdetektoren, die durch Plastikfolien als Kontaminationsschutz abgedeckt waren. Die Ausgangsimpulse der beiden Detektoren werden von je einem Vorverstärker und einem Hauptverstärker getrennt verstärkt, auf gleiche Höhe abgeglichen und dann von einem Summierer addiert. Die gemessenen Impulse werden digital angezeigt. Bei einer Hochspannung von 800 V lag der Nulleffekt zwischen 200 und 300 cpm und die Ausbeute bei 3,1 Prozent. Die Konstanz der Meßanordnung wurde mit einem ^{125}J -Standard überwacht.

Um den Linearitätsbereich zu bestimmen, wurden ^{125}J -Meßproben verschiedener Aktivität ausgemessen (Abb. 3.7.a). Eine Korrektur der gemessenen Zählraten ist erst ab $2 \cdot 10^6$ cpm erforderlich. Die Absorption durch den Körper der Mäuse konnte abgeschätzt werden, indem $20\text{ }\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ als Injektionslösung (0,2 ml) und nach der Injektion in Mäuse im Ganzkörperzähler ausgemessen wurden. Die dabei ermittelte Absorption durch das Gewebe betrug 27 Prozent.

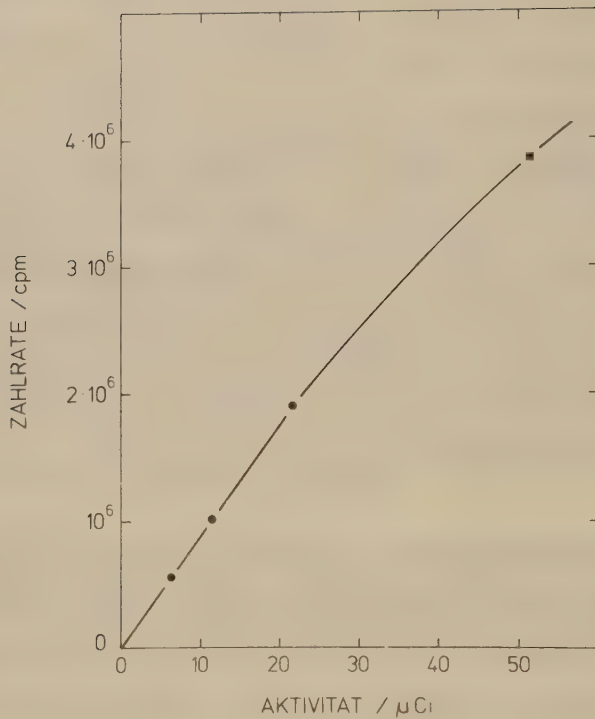


Abb. 3.7. : Zählverlust-Korrekturkurve des Ganzkörperzählers

3.8. Messung des nekrotischen Anteils

Durch intraperitoneale oder intravenöse Injektion von Vitalfarbstoffen können in solide wachsenden Tumoren Regionen unterschiedlicher Blutversorgung sichtbar gemacht werden. Die Farbstoffe gelangen nur in Bereiche, in denen das Blut zirkuliert. Nach i.v. Applikation geht Lissamin-Grün innerhalb von 30 Sekunden in die interstitielle Flüssigkeit über und verteilt sich sehr schnell, ohne in lebende Zellen einzudringen. Der Farbstoff wird innerhalb von 12 bis 24 Stunden nach Injektion über die Niere und die Gallenblase ausgeschieden.

In den nicht angefärbten Gebieten befinden sich neben einem überwiegenden Anteil toter Zellen auch einige lebende Zellen, die ihren Energiebedarf hauptsächlich durch anaerobe Glykolyse decken. Der interstitielle Transport in diesen Gebieten ist stark herabgesetzt; Farbstoffe, die in sie gespritzt worden sind, können 24 Stunden später scharf abgegrenzt entlang des Injektionskanals wahrgenommen werden (Goldacre & Sylvén, 1959, 1962; Lewis et al., 1968; Rogers et al., 1967; Owen, 1960; Warburg, 1956).

In den Experimenten wurde das dem Lissamin-Grün verwandte Lichtgrün SF verwendet. Die tumortragenden Mäuse wurden 1 Stunde nach intraperitonealer Injektion von 1 ml einer 2% Lösung getötet, die Tumoren mit dem Skalpell aufgeschnitten und der Nekroseanteil bestimmt, indem die nicht angefärbten, herausgeschnittenen Tumorbezirke gewogen wurden. Die Exzision der nekrotischen Bereiche bereitet kaum Schwierigkeiten, da sie sich als kompakte Gewebestücke überwiegend in den distalen Tumorarealen befanden. Die Gleichsetzung Nekrose = nicht angefärbte Bereiche ist möglich, da man nach Anfärbung dieser Bereiche mit Erythrosin B erkennt, daß der Anteil der lebenden Zellen in diesen Gebieten unter 1 Prozent liegt. Das Volumen der nekrotischen Zellen ist gegenüber dem der lebensfähigen Zellen um ungefähr einen Faktor 2 vermindert. Die ^{125}J -Aktivitätsverteilung zwischen nekrotischen und vitalen Tumorbezirken wurde ebenso bestimmt, die Aktivitätsmessung erfolgte im Ganzkörperzähler.

Nach intratumoraler Injektion der Farbstofflösung (0,1 ml) zeigt sich auch beim Carcinom E0 771 ein gegenüber dem vitalen Tumorgewebe verlangsamter interstitieller Transport in den nach i.p. Injektion nicht angefärbten Bereichen.

3.9. Herstellung toter markierter Zellen

Die Geschwindigkeit der Ausscheidung ^{125}J -markierter Abbauprodukte läßt sich nach Hofer et al. (1969) durch Injektion abgetöteter markierter Zellen in Tumoren unterschiedlicher Größe bestimmen.

Um die Messungen am Tumormeßplatz über einen längeren Zeitraum mit einer ausreichenden Zählrate durchführen zu können, erfolgte die Markierung der Tumorzellen mit ^{125}J -UdR in sterilen Probenröhrchen. Rund 25 Millionen Tumorzellen/Röhrchen wurden in Fischer's Medium 15 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt und danach mit $40\text{ }\mu\text{Ci } ^{125}\text{J}$ -UdR/Röhrchen über einen Zeitraum von einer halben Stunde inkubiert. Der Einbau wurde im Eisbad gestoppt. Nach dreifachem Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung und Zentrifugation (10 Minuten bei 700 U/min, 4°C) betrug der Anteil der freien Aktivität an der Gesamtaktivität 4 bis 9 Prozent. Nachdem die Zellen durch Erhitzen im Wasserbad (15 Minuten bei 80°C) abgetötet worden waren (Hofer et al., 1969) wurden eine Million abgetöteter Zellen/0,1 ml NaCl-Lösung an einer Stelle des Tumors bzw. des gesunden Beins injiziert. Gesunde Mäuse, die die abgetöteten Zellen intramuskulär verabreicht bekamen, entwickelten keine Tumoren. Die ^{125}J -Ausscheidung wurde weder von der Aktivitätsmenge, mit der die Zellen inkubiert wurden, noch davon beeinflusst, ob die Injektionslösung an einer Stelle des Tumors oder an vier verschiedenen Stellen des Tumors mit je einem Viertel der Lösung injiziert wurde.

Für die autoradiographischen Untersuchungen und die Messungen am Flüssigkeitsszintillationszähler wurden 2 Gruppen mit sechs Tage alte Tumoren in-vivo mit insgesamt je $100\text{ }\mu\text{Ci } ^3\text{H-TdR}$ (spezifische Aktivität 27 Ci/mMol) bzw. ^{125}J -UdR markiert. Die Gesamtaktivität - verteilt auf drei Portionen - wurde im Abstand von je 5,5 Stunden intraperitoneal verabreicht, um einen möglichst großen Anteil proliferierender Zellen zu markieren. Neun Stunden nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet, eine Zellsuspension hergestellt, gewaschen und die Tumorzellen im Wasserbad abgetötet. Der Anteil der säurelöslichen Fraktion an der ^{125}J -Gesamtaktivität betrug 3,7 Prozent,

der DNA/RNA-Komplex der mit ^3H -TdR markierten Zellen enthielt 90 Prozent der ^3H -Aktivität.

Für diese autoradiographischen Experimente wurden pro Gruppe 3 Tiere am vierten Tag nach intratumoraler Injektion von toten, ^3H -TdR markierter Zellen getötet, die Tumoren in 4% gepufferter Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Von jedem Tumor wurden in Längsrichtung des Tumors mehrere Schnitte im Abstand von 1-2 mm angefertigt. Nach dem Entparaffinieren wurden die Objektträger in der Dunkelkammer in eine Filmemulsion getaucht (Dipping - Technik, Emulsion: Kodak NTB 2), einen Tag lang getrocknet und dann in lichtdichten Kästen zusammen mit einem Trockenmittel im Kühlschrank aufbewahrt. Nach einer Expositionszeit von 10 Wochen wurden die Filme entwickelt, fixiert, gewässert und die Tumorschnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Der Background wurde mit Schnitten überprüft, die keine Aktivität enthielten (Feinendegen, 1967).

4. Ergebnisse

- 4.1. Tumorwachstum und Serientransplantation
- 4.2. Bestimmung der Tumorzelldosis₅₀ (TD₅₀)
- 4.3. Toxizität von Joddesoxyuridin
- 4.4. Einbau von ¹²⁵J-UdR in C57BL/6J Mäusen
- 4.5. Anflutung von ¹²⁵Joddesoxyuridin in den Tumor
- 4.6. Abschätzung des Anteils nicht DNA-gebundener ¹²⁵J-Aktivität
- 4.7. ¹²⁵Jod-Retention bei verschiedenen Tumorumfängen
- 4.8. ¹²⁵J-Aktivitätsverteilung zwischen nekrotischem und vitalem Tumorgewebe
- 4.9. Aktivitätsretention im Tumor nach Injektion toter markierter Zellen
 - 4.9.1. In-vitro Markierung
 - 4.9.2. In-vivo Markierung

4.1. Tumorwachstum und Serientransplantation

Nach einer makroskopisch nicht erfaßbaren Wachstumsphase ("silent interval") läßt sich die Tumorentwicklung beim Mammaadenocarcinom durch Wiegen von exzidiertem Tumorgewebe (Abb. 4.1.a) oder durch externe Messung mit der Schublehre verfolgen (Kap. 3.3., 3.8).

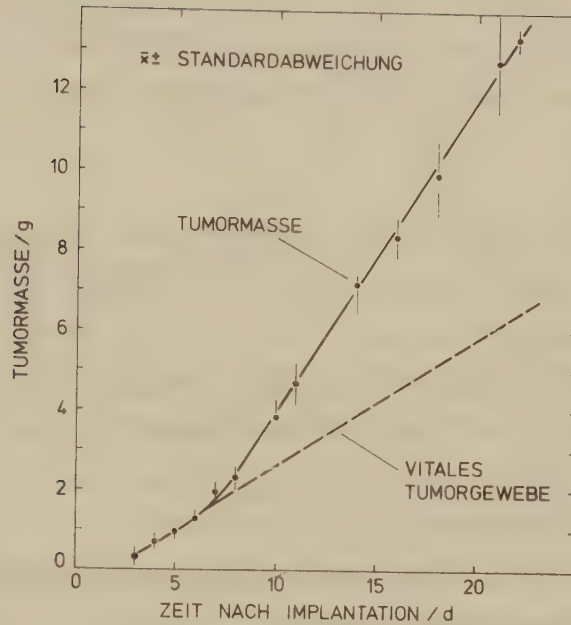
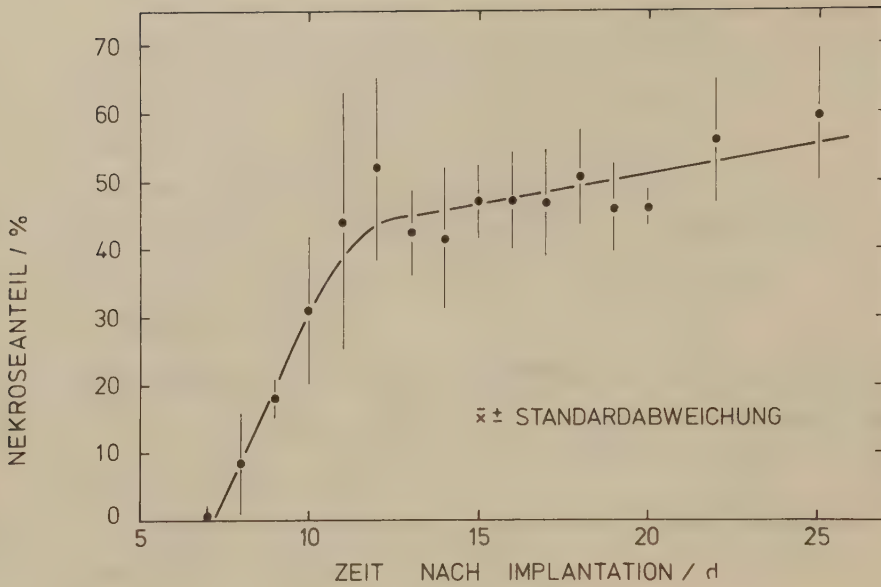


Abb. 4.1.a: Wachstumskurve der Tumormasse und des vitalen Tumorgewebes

Die Anpassung einer Potenzfunktion an alle gemessenen Werte ergibt eine schlechtere Übereinstimmung, als wenn das Wachstum der Tumormasse in zwei Abschnitte unterteilt wird und ab dem achten Tag nach Implantation linear erfolgt. Eine Gompertzfunktion kann nicht zur mathematischen Wachstumsbeschreibung verwandt werden, da die relative Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}/V$ der Tumormasse nicht exponentiell abfällt (Abb. 4.1.c). Die Tumormasse setzt sich aus vitalem und abgestorbenem Gewebe zusammen. Abgesehen von kleinen Tumorumfängen läßt sich das Wachstum des vitalen Gewebes gut mit einer linearen Gleichung beschreiben.



4.1.b: Anteil der Nekrose an der Tumormasse als Funktion der Zeit nach Implantation

In starkem Maße entwickeln sich ab dem siebten Tag nach Implantation nekrotische Bereiche (Abb. 4.1.b). Ihre Zunahme verlangsamt sich vom 12. Tag an. Der Anstieg des nekrotischen Anteils deutet darauf hin, daß die Entstehung nekrotischen Gewebes ihre Elimination übertrifft.

Das abgestorbene Gewebe läßt sich auch auf histologischen Schnitten eines 5 und eines 19 Tage alten Tumors erkennen. Beim jungen Tumor durchwachsen die Tumorzellen die reichlich vorhandene Muskulatur in zusammenhängenden, tatzenförmigen, soliden Komplexen. Ganz vereinzelt sieht man pyknotische Stellen; ihr Anteil am Tumor ist aber gering, so daß er mit der Lichtgrün-Methode nicht erfaßt werden kann. Der Anteil der pyknotischen Zellen hat sich beim größeren

Tumor auf schätzungsweise 60 Prozent erhöht. Nur selten findet sich eine völlige Auflösung der pyknotischen Kerne. In vitalen Tumorgebieten kommen häufig Mitosen vor. Beim Übergang in den pyknotischen Typ verkleinern sich sowohl die Zellkerne als auch das Zytoplasma bei der Abrundung. Entzündungszellen und Makrophagen finden sich selbst in den Randpartien der pyknotischen Gebiete bei beiden Tumoren extrem selten.

Ein Vergleich eigener Untersuchungen biologischer und zellkinetischer Art mit früheren Veröffentlichungen (Tab. 4.1., Abb. 4. 1.c) zeigt, daß sich die Parameter mit zunehmender Transplantationszahl verändert haben. Die Anzahl n der Passagen wurde aus den Angaben von Sugiura (1962) abgeschätzt.

- Die Spontanregression, die Verdopplungszeit und die Überlebenszeit verringern sich mit der Zahl der Transplantationen. Diese Beobachtung stützt die Hypothese (Steel et al., 1971), daß bei der Verwendung von Experimentaltumoren eine immunologische Selektion von Zellen mit einer hohen Wachstumspotenz stattfindet. Auch andere Autoren berichten über durch Transplantationen hervorgerufene Veränderungen bei den untersuchten Tumoren (Begg, 1971; McCredie et al., 1971; Silini & Maruyama, 1965).

Bei kleiner Passagenanzahl (Abb. 4.1.c) kann das Wachstum in 3 Bereiche unterteilt werden (Porschen & Feinendegen, 1969):

- 1) Exponentialphase
- 2) Bremsphase
- 3) Plateauphase

Autor	Passagen- anzahl n	Spontan- regression %	Tumoran- gehrate %	Überlebens- zeit d	initiale Verdopplungs- zeit h
Kidder et al. 1949	140	—	—	—	27
Ting 1952	186	—	—	mindestens 33	27
Sugiura & Stock 1952	186	11	100	28–56	—
Snell et al. 1953	212	—	100	—	—
Dunham & Stewart 1953	212	11	100	19–56	—
Sugiura 1962	326	2	—	21–28	—
R. Porschen 1976	875	0	100*	25–32*	16,5**

* Diese Werte gelten für 10^3 bis 10^6 injizierte Zellen (Kap. 4.2.)

** Mittelwert aus mehreren Versuchen

Tab. 4.1.: Veränderungen verschiedener Parameter des Carcinoms EO 771 mit steigender Transplantationsanzahl

Diese Unterteilung läßt sich bei höherer Passagenzahl nicht beobachten. Die relative Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}/V$ fällt hier sehr schnell auf kleine Werte ab.

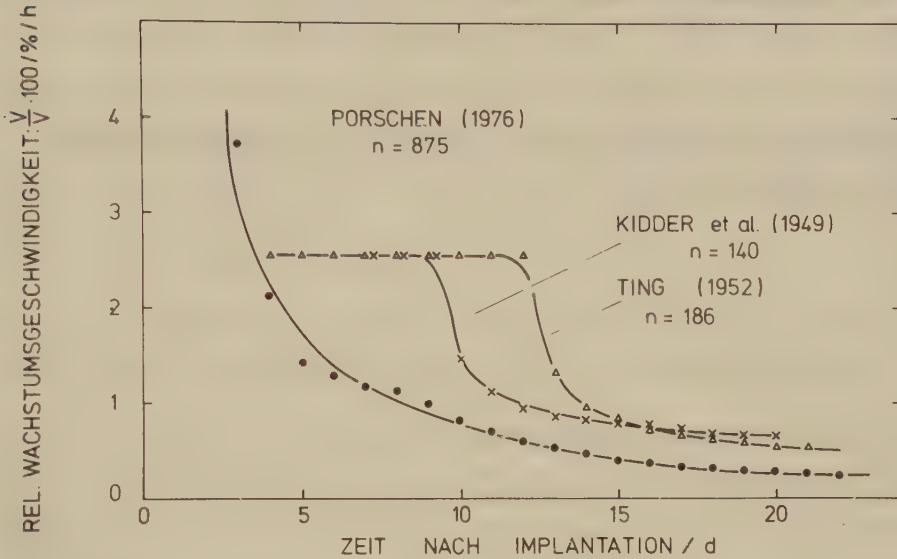


Abb. 4.1.c: Relative Wachstumsgeschwindigkeit als Funktion der Zeit bei verschiedenen Transplantationsserien.

Ting (1952) gibt an, daß sich von der Bremsphase an ($V = 2000 \text{ mm}^3$) Zysten, Exulzerationen und nekrotische Gebiete entwickeln. Seine Wachstumskurve kann durch eine Gompertzfunktion beschrieben werden:

$$V = V_0 \cdot e^{\frac{A}{\alpha} (1 - e^{-\alpha \cdot t})}$$

Hierbei beträgt $A = 0,666 \pm 0,304 \text{ d}^{-1}$ und $\alpha = 0,063 \pm 0,022 \text{ d}^{-1}$ (Laird, 1964).

Auch die Reaktion des Tumors gegenüber Bestrahlung hat sich verändert. Während der Tumor jetzt auf eine Radiotherapie mit einem

wellenförmigen Verlauf der relativen Wachstumsrate und einer Schrumpfung des Tumors reagiert (Heitmann, 1977; Konietzny, 1977; Porschen et al., 1979), wurde früher bei weiterhin exponentiellem Verlauf der Wachstumskurve nach Behandlung nur die relative Wachstumsgeschwindigkeit herabgesetzt (Ting, 1952).

Während dieser experimentellen Untersuchung konnten keine Veränderungen im Wachstumsverhalten des Adenocarcinoms festgestellt werden.

4.2. Bestimmung der Tumorzelldosis₅₀ (TD₅₀)

Unter der Tumorzelldosis₅₀ (TD₅₀) versteht man die Zellzahl, die bei 50 % der Empfängertiere einen Tumor hervorruft. Sie kann aus der Tumorangehrate nach Injektion abgestufter Zellzahlen bestimmt werden (Fortner et al., 1975; Maruyama and Feola, 1973; Silini and Maruyama, 1965).



Abb. 4.2.a: Versuchsablauf

$10^1 - 10^6$ Tumorzellen wurden 6 Gruppen mit jeweils 10 Mäusen implantiert. Tiere mit Bißwunden wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Während die Überlebenszeit der Tumorträger mit der implantierten Zellzahl exponentiell abnimmt, steigt die Tumorangehrate bis zu einem Wert von 100 % bei 10^3 injizierten Tumorzellen an (Abb. 4.2.b). Die TD₅₀ beträgt 24 Zellen.

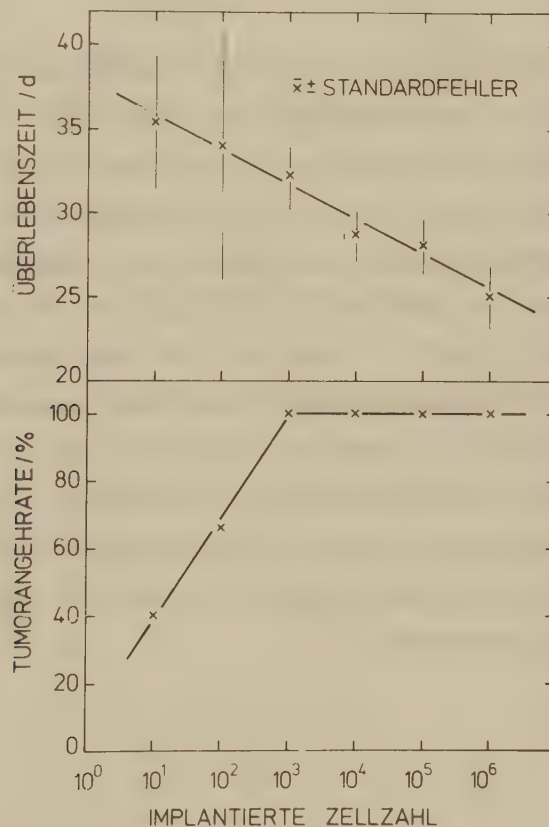


Abb. 4.2.b: Überlebenszeit und Tumorangehrate als Funktion der Zellzahl beim Adenocarcinom EO 771 auf C 57BL/6J Mäusen.

4.3. Toxizität von Joddesoxyuridin

4 Gruppen mit jeweils 17 Tieren wurden bei einem Tumorumfang von 725 mm^3 (5 Tage alt) 5, 10, 20 und $50 \mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ /0,2 ml isotonischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert, um den Einfluß von $^{125}\text{J-UdR}$ auf biologische Parameter zu untersuchen. Die Gesamtmenge an J-UdR pro Maus wurde durch Zugabe von kaltem J-UdR konstant gehalten und betrug $0,55 \mu\text{g}$; die gelieferte spezifische Aktivität von $^{125}\text{J-UdR}$ $91,3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ($= 32,32 \text{ Ci/mMol}$). Einer Kontrollgruppe wurde 0,2 ml Kochsalzlösung/Maus i.p. injiziert.

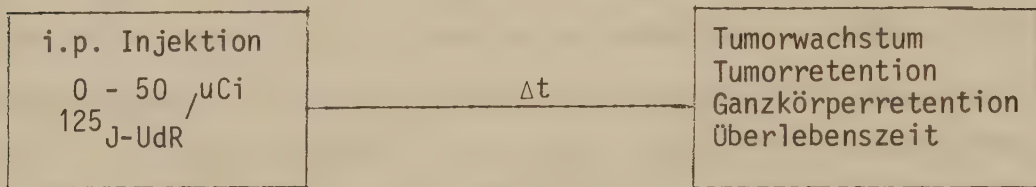


Abb. 4.3.a: Versuchsablauf

Der Tumordurchmesser wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Implantation mit der Schublehre bestimmt (Abb. 4.3.b). Pro Meßpunkt wurde der Durchmesser jedes Tumors dreimal gemessen, um den Meßfehler klein zu halten. Innerhalb der Standardabweichung besteht zwischen dem Wachstum der Gruppen, die $^{125}\text{J-UdR}$ erhalten haben, und dem der Kontrolle kein Unterschied. Auch die Injektion von $20 \mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ bei verschiedenen Tumorumfängen beeinflusste das Tumorstadium nicht. Abbildung 4.3.c zeigt die auf 50 Stunden nach Injektion normierten Retentionskurven der Tumorstadium. Die Aktivitätsverlustraten λ_L sind innerhalb der Fehler unabhängig von der injizierten Aktivität (Tab. 4.3.a). Die Standardabweichungen wurden aus den Verlustraten λ_L jeder einzelnen Maus berechnet.

Injizierte Aktivität / μCi	Aktivitätsverlustrate $\pm$ Standardabweichung %/h
5	$0,50 \pm 0,08$
10	$0,46 \pm 0,11$
20	$0,44 \pm 0,07$
50	$0,50 \pm 0,04$

Tab. 4.3.a: Aktivitätsverlustraten bei verschiedenen $^{125}\text{J-UdR}$ Dosen

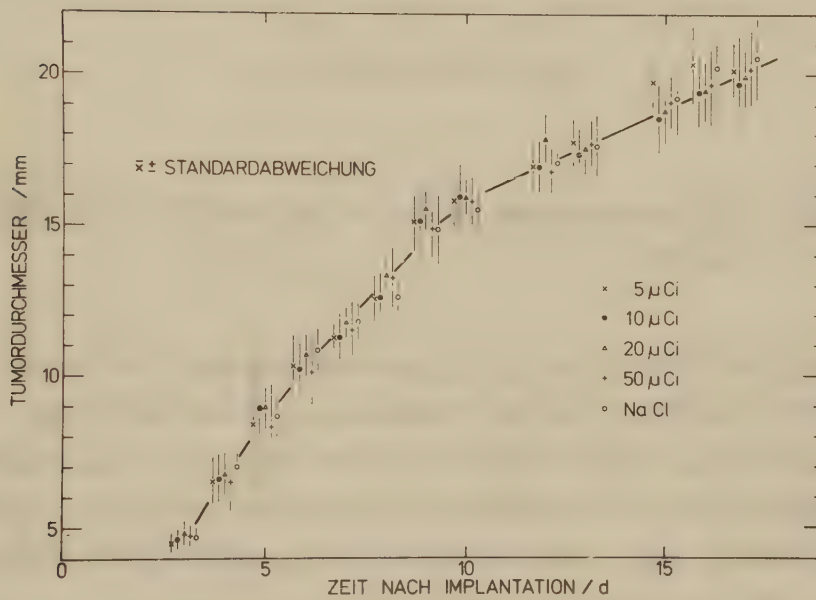


Abb. 4.3.b: Tumordurchmesser als Funktion der Zeit

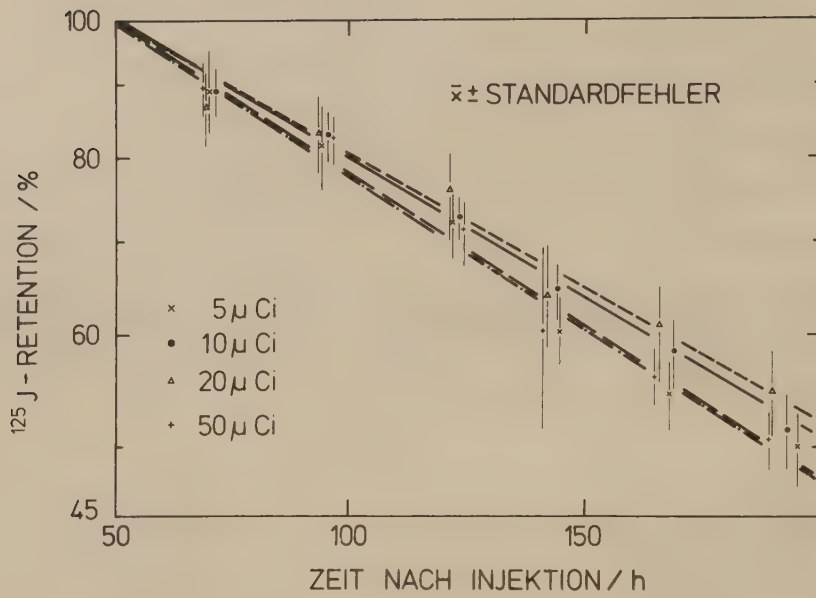


Abb. 4.3.c: ^{125}J -Tumorretention bei verschiedenen ^{125}J -UdR-Dosen.

Der Einbau von ^{125}J -UdR in das Mammaadenocarcinom ist in Abbildung 4.3.d als Funktion der angebotenen Aktivität dargestellt. Der Einbau ist im Bereich von 5 - 50 µCi proportional zur applizierten Aktivitätsmenge. Dies deutet darauf hin, daß die DNA-Synthese des Carcinoms EO 771 durch die Injektion des markierten DNA-Vorläufers nicht gestört wird.

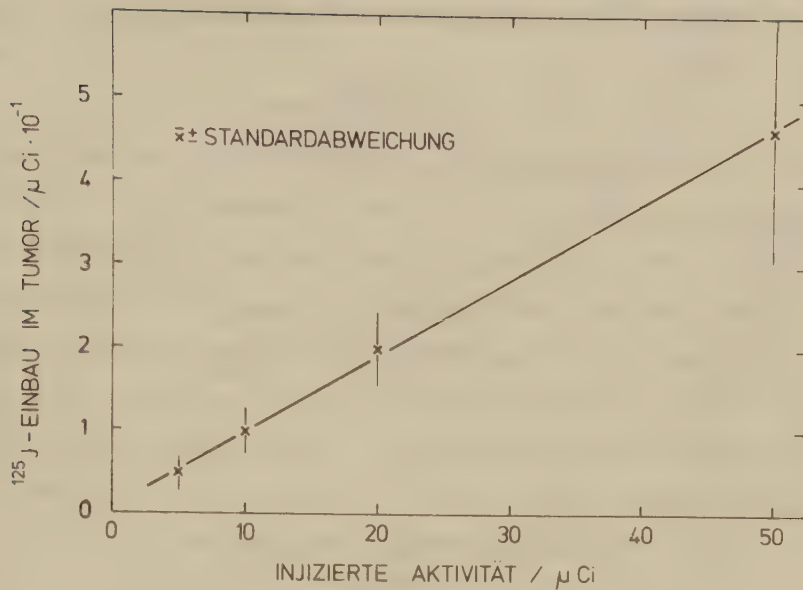


Abb. 4.3.d: ^{125}J -Einbau im Tumor als Funktion der injizierten Aktivität

Die Ganzkörperretention von ^{125}J -UdR wurde im Ganzkörperzähler über einen Zeitraum von 290 Stunden nach Injektion gemessen (Abb. 4.3.e). Die im Tumorbein fixierte Aktivität wurde von der Zählrate am Ganzkörperzähler subtrahiert und die Meßwerte auf 50 Stunden nach Injektion normiert. Die Ergebnisse der Gruppe, die 5 μCi ^{125}J -UdR erhalten hatte, sind nicht aufgeführt, da bei ihr die Exkretion des freien radioaktiven Jodids zu diesem Zeitpunkt noch nicht beendet war. Die Abnahme der Aktivität nach Injektion von 10 oder 50 μCi ^{125}J -UdR ist gegenüber der Gruppe, der 20 μCi injiziert wurde, geringfügig beschleunigt. Ab 170 Stunden nach Injektion verlaufen die Kurven annähernd parallel. Die relativen Fehler der Mittelwerte lagen zwischen 9 und 13 Prozent. Der Ganzkörpereinbau steigt linear mit der applizierten Aktivität an.

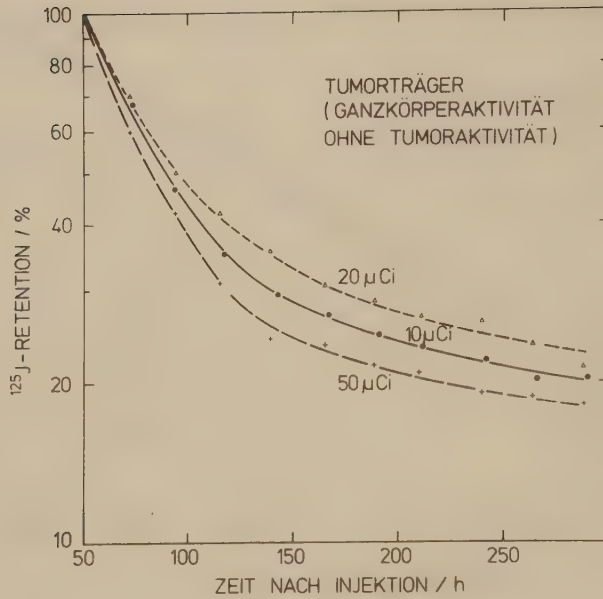


Abb. 4.3.e: ^{125}J -Ganzkörperretention nach Injektion verschiedener Dosen als Funktion der Zeit nach Injektion.

Während der Dauer des Experimentes wurde für jede Maus der Todeszeitpunkt notiert (Tab. 4.3.b). Tiere mit starken Bißwunden wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

injizierte Aktivität/ μCi	Anzahl der ausgewerteten Tiere	Überlebenszeit nach Implantation $\pm$ Standardabweichung/d
0	10	28,2 $\pm$ 2,74
5	17	23,24 $\pm$ 5,08
10	15	23,33 $\pm$ 4,27
20	11	25,36 $\pm$ 4,90
50	15	24,87 $\pm$ 2,88

Tab. 4.3.b: Überlebenszeiten der tumortragenden Mäuse nach Injektion von 0 - 50 μCi ^{125}J -UdR.

Die Kontrollmäuse überleben zwischen 3 und 5 Tage länger als Mäuse, die verschiedene Aktivitätsmengen $^{125}\text{J-UdR}$'s bekommen haben.

Um den Einfluß von $^{125}\text{J-UdR}$ in Abhängigkeit von der injizierten Aktivität zusammenfassen zu können, wurde bei jedem untersuchten Parameter derjenigen Aktivität, die den stärksten bzw. schwächsten Effekt verursachte, willkürlich der Wert 4 bzw. 1 zugeordnet. Die Summe dieser Werte wurde für jede Aktivität durch die Anzahl der Untersuchungen geteilt, da der Wert der Ganzkörperretention für 5 μCi fehlte. Diese Berechnung führte zu einem Wert von 2,67 für 5 μCi , 2 für 10 μCi , 1,25 für 20 μCi und zu einem Wert von 3 für 50 μCi .

Der Einfluß von kalten J-UdR wurde an Hand der Überlebenszeiten tumortragender Mäuse bestimmt. Hierbei zeigt sich, daß die Mäuse nach intraperitonealer Injektion von 0,55 $\mu\text{g J-UdR/Maus}$ nicht früher starben als die Kontrollmäuse. Somit werden die oben aufgeführten Veränderungen der untersuchten biologischen Parameter nur durch den radiotoxischen Einfluß von $^{125}\text{J-UdR}$ hervorgerufen. Wegen dieser Ergebnisse wurden die nächsten Experimente mit 20 $\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ durchgeführt, die injizierte J-UdR Menge überschritt nicht 0,55 $\mu\text{g/Maus}$.

4.4. Einbau von $^{125}\text{J-UdR}$ in C 57 BL/6 J Mäusen

20 gesunde Mäuse erhielten 20 μCi $^{125}\text{J-UdR}$ i.p. injiziert, um festzustellen, wieviel Prozent der injizierten Dosis im Körper eingebaut werden. Die Messungen erfolgten im Ganzkörperzähler (Abb. 4.4.a).

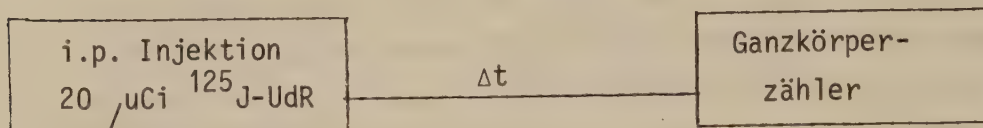


Abb. 4.4.a: Versuchsablauf

Während der ersten 25 Stunden fällt die Ganzkörperaktivität mit einer Halbwertszeit von 5 bis 6 Stunden ab (Abb. 4.4.b). 48 Stunden nach Injektion sind $5,4 \pm 1,75 \%$ der injizierten Aktivität eingebaut (In einem anderen Versuch waren es $3,87 \pm 0,43 \%$). Nach $^{125}\text{J-UdR}$ Injektion in Tumorträger mit verschiedenen alten Tumoren betrug der Einbau (ohne Tumor) $4,62 \pm 0,67 \%$ (3 Tage alt), $7,03 \pm 1,59 \%$ (5 Tage alt) und $6,89 \pm 2,55 \%$ (9 Tage alt).

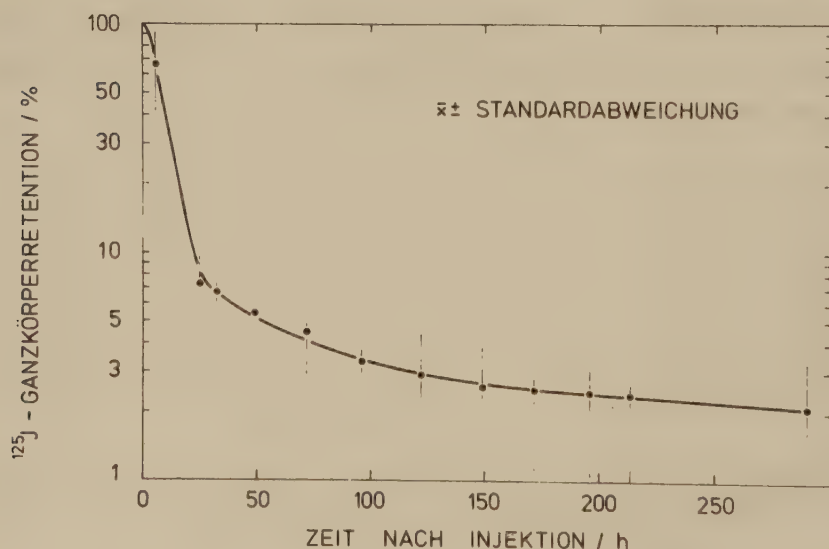


Abb. 4.4.b: ^{125}J -Ganzkörperretention gesunder C 57 BL/6 J Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion.

Der Kurvenverlauf im Bereich von 30 bis 150 Stunden nach Injektion reflektiert die Summe der Verlustraten proliferierender Zellpopulationen mit kurzer Lebensdauer. Später als 150 Stunden nach Injektion gibt der Aktivitätsverlust (0,14 %/h) den Umsatz langsam proliferierender Gewebe an.

Die ^{125}J -Retention in gesunden Hinterbeinen von Tumorträgern ($V = 1852 \text{ mm}^3$, Tumoralter 9 d) und von gesunden Tieren wurde nach Injektion von $20 \text{ } \mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ am Tumormeßplatz gemessen (Abb. 4.4.c).

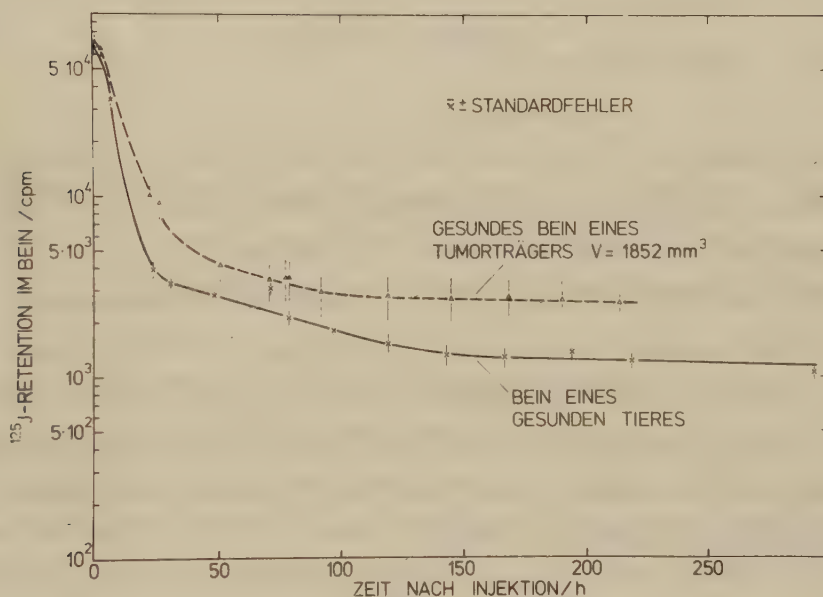


Abb. 4.4.c: Unterschiede in der ^{125}J -Retention des gesunden Beins von Tumorträgern und gesunden Mäusen.

Nach der Ausscheidungsphase folgen ähnlich wie bei der Ganzkörperretention zwei Komponenten mit unterschiedlichen Umsatzraten. Der Einbau von $^{125}\text{J-UdR}$ 50 Stunden nach Injektion differiert um einen Faktor 1,5.

4.5. Anflutung von $^{125}\text{Joddesoxyuridin}$ in den Tumor

Eine Gruppe mit gesunden Mäusen ($n = 4$) und 5 Gruppen mit Tumorträgern ($n = 4$) erhielten eine intraperitoneale Injektion von $20 \mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR/Maus}$. In kurzen Zeitabständen danach wurden die Zählraten der gesunden bzw. der tumortragenden Beine am Tumormeßplatz gemessen (Abb. 4.5.a).

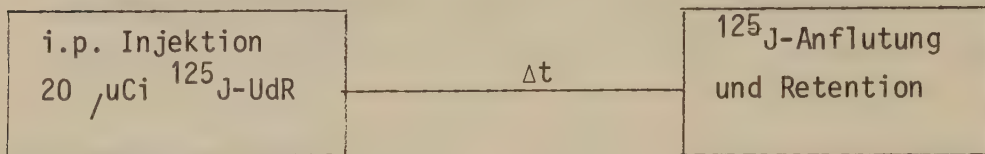


Abb. 4.5.a: Versuchsablauf

Nach der Applikation steigt die Zählrate bei allen Versuchsgruppen rasch an, bis zu verschiedenen Zeiten nach Injektion eine weitgehend konstante Zählrate erreicht wird (Tab. 4.5.a). Auch das Maximum der Zählrate und die Dauer der Plateauphase nehmen mit steigendem Tumolvolumen zu. Im Anschluß an dieses "Plateau" nimmt die Zählrate ab und stellt ca. 50 Stunden nach Injektion die eingebaute Aktivität dar (Abb. 4.5.b) Diese Messungen konnten durch kontinuierliche Registrierung mit einem Schreiber bestätigt werden ($n = 2$).

Tumolvolumen	Zeit bis zum Erreichen des Plateaus	Dauer des Plateaus	Halbwertszeit der Anflutungsphase
mm^3	min	min	min
0	12 - 14	50 - 60	3,5
210	10 - 14	90 - 130	2,3
460	15 - 20	130 - 150	4,6
1896	30 - 40	300 - 350	9,7
2917	35 - 50	210 - 235	9,0
3397	50 - 55	200 - 250	11,6

Tab. 4.5.: Aufnahme von $^{125}\text{J-UdR}$ in den Tumor nach intraperitonealer Injektion.

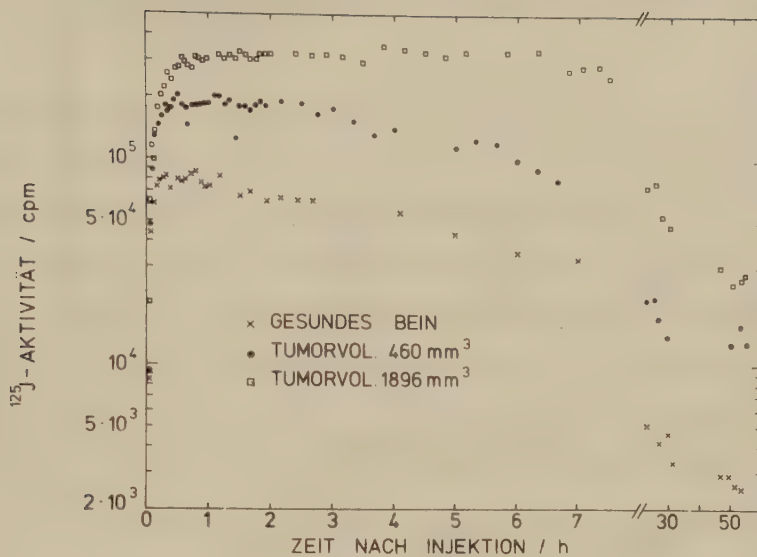


Abb. 4.5.b: Fortlaufende Messung der ^{125}J -Aufnahme in den Tumor; gezeigt sind die Meßergebnisse von 2 Tumorgruppen und einer Gruppe gesunder Mäuse.

Von der Aktivität, die eine Stunde nach Injektion in den Tumoren vorhanden ist, wird bei größeren Volumina ein höherer Prozentsatz eingebaut als bei kleinen Volumina, da die Tumorzellen dann infolge der längeren Verweildauer und der langsameren Anflutung ^{125}J -UdR besser verwerten können, weil möglicherweise während dieser Zeit zusätzlich Zellen von der G_1 -Phase in die S-Phase eintreten können (Abb. 4.5.c). Das gesunde Bein inkorporiert 6,76 % der 1 Stunde nach Injektion angebotenen Aktivität.

Mit steigender Tumorgröße nimmt die Zählrate des Plateaus zu, dieser Anstieg ist bei kleinen Tumoren besonders stark ausgeprägt. Dahingegen fällt die Zählrate pro Volumeneinheit Tumorgewebe schnell ab (Abb. 4.5.d). Bei der Berechnung wurde die Zählrate des gesunden Beins 1 Stunde nach Injektion von den Tumorwerten subtrahiert, da die Messungen bei kleinen Tumoren von der vorhandenen Muskulatur beeinflußt werden.

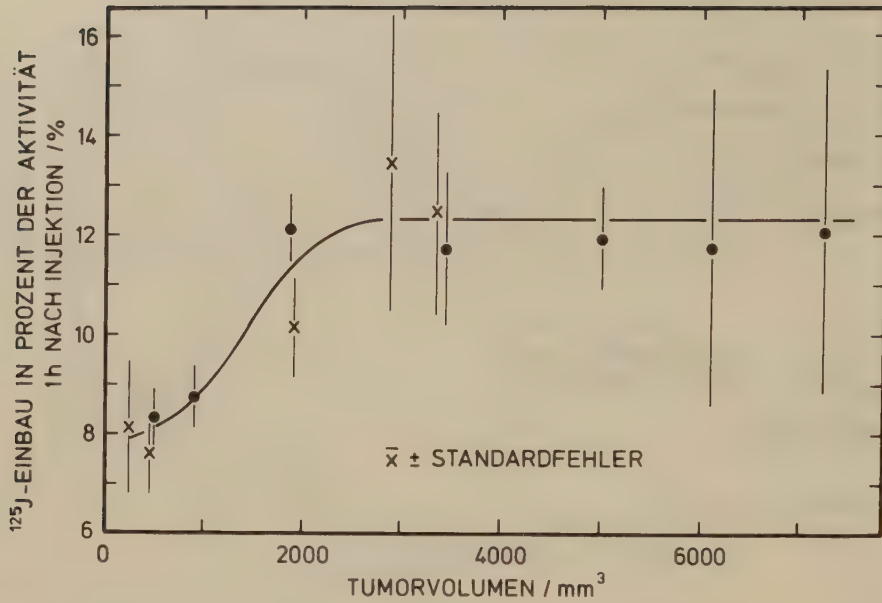


Abb. 4.5.c: Beeinflussung des relativen ^{125}J -Einbaus in den Tumor durch die Geschwindigkeit der ^{125}J -Anflutung.

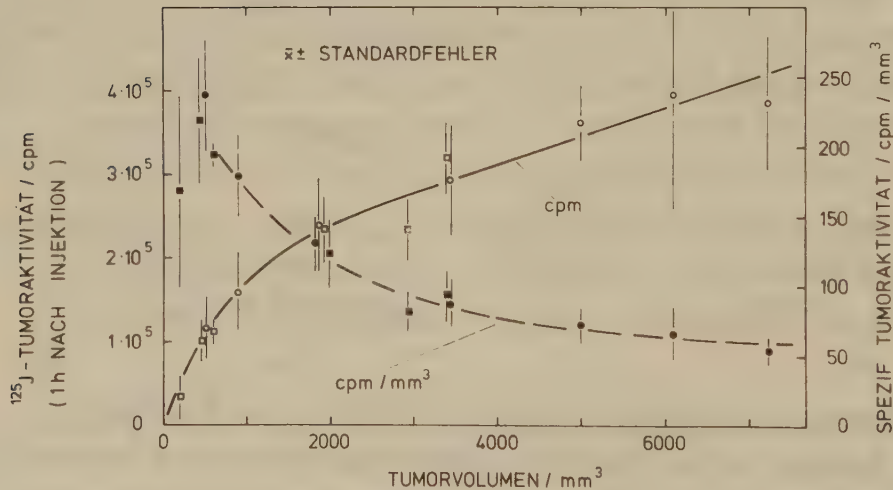


Abb. 4.5.d: In Abhängigkeit vom Tumolvolumen zum Zeitpunkt der Injektion wurden für 2 verschiedene Versuche die absoluten und spezifischen Zählraten 1 Stunde nach Injektion aufgezeichnet.

4.6. Abschätzung des Anteils nicht DNA-gebundener ^{125}J -Aktivität

Da ungefähr 95 % des injizierten ^{125}J -UdR zu Jodid abgebaut werden (Hughes et al., 1964; Prusoff et al., 1960), kann das Schicksal des $^{125}\text{J}^-$, das von ^{125}J -UdR stammt und nicht in die DNA eingebaut wird, verfolgt werden, indem eine zweite Versuchsgruppe eine gleiche Aktivitätsmenge Na^{125}J erhält. An Hand des zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion gemessenen Verhältnisses $\text{Na}^{125}\text{J} / ^{125}\text{J}$ -UdR kann der nicht DNA-gebundene Anteil der Tumoraktivität bestimmt werden (Begg, 1975; Hughes et al., 1964).

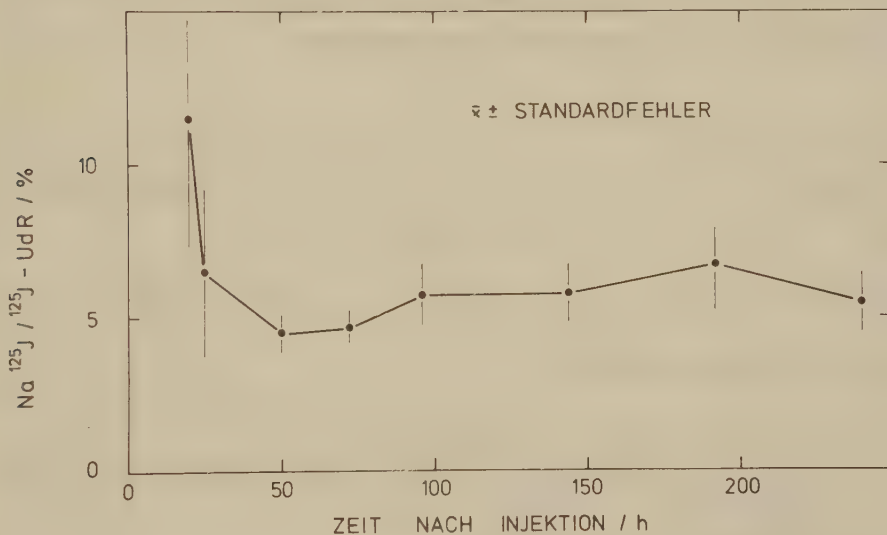


Abb. 4.6: Nicht DNA-gebundene Aktivität im Tumorgewebe als Funktion der Zeit nach Injektion.

Bei einem Tumolvolumen von 750 mm^3 wurden $2 \text{ } \mu\text{Ci Na}^{125}\text{J}$ (spezifische Aktivität $25,4 \text{ Ci/mMol J}^-$, $n = 10$ Tiere) bzw. $2 \text{ } \mu\text{Ci } ^{125}\text{J}$ -UdR ($n = 10$ Tiere) in $0,1 \text{ ml}$ physiologische Kochsalzlösung in die Tumoren injiziert. Das Verhältnis

$\text{Na}^{125}\text{J}/^{125}\text{J-UdR}$ wurde aus den Tumormeßplatzzählraten bestimmt. Abbildung 4.6. zeigt, daß später als 50 Stunden nach Injektion zwischen 4,5 und 7 Prozent der Gesamtaktivität zur nicht DNA-gebundenen Aktivität zählen. Da der DNA-gebundene Anteil der Tumoraktivität bis zu 240 Stunden nach Injektion nahezu konstant bleibt, ist es nicht nötig, die ^{125}J -Retentionskurven über den Anteil der nicht DNA-gebundenen Aktivität zu korrigieren, um die Verlustraten der DNA-gebundenen Aktivität zu ermitteln.

4.7. ^{125}J -Jod-Retention bei verschiedenen Tumorumfängen

Bei verschiedenen Tumorumfängen wurden jeweils 20 $\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}/$ 0,2 ml Kochsalzlösung den Mäusen intraperitoneal appliziert und die ^{125}J -Retention am Tumormeßplatz gemessen.

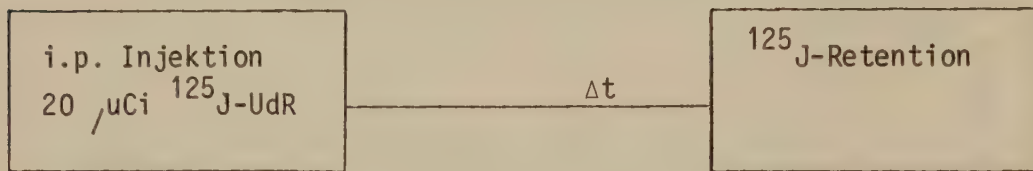


Abb. 4.7.a: Versuchsaufbau

Der Verlauf der ^{125}J -Retention im Tumor kann in drei Abschnitte unterteilt werden (Abb. 4.7.b):

1) 0 - 50 Stunden nach Injektion

Der schnelle Abfall der Zählraten spiegelt die Elimination des nicht eingebauten ^{125}J -Jodids wider (Kap. 4.6).

2) 50 - 175 Stunden nach Injektion

Im Gegensatz zu den anderen Gruppen beobachtet man bei einem Tumorumfang von 35 mm^3 einen Anstieg der Zählrate 50 bis 80 Stunden nach Injektion. Dies weist darauf hin, daß auch bei diesem syngenem Wirt - Tumor - System markierte Leukozyten in

den Tumor einwandern (Pittner, 1971). Anscheinend findet aber die Einwanderung von markierten Wirtszellen nur in einem geringen Maße statt, so daß sie bei größeren Tumoren durch die bedeutend höhere Tumoraktivität verschleiert wird. Aus der Neigung der Geraden läßt sich der prozentuale Aktivitätsverlust pro Stunde berechnen.

3) 175 - 300 Stunden nach Injektion

Die Aktivitätsverlustrate in diesem Zeitintervall ist unabhängig vom Injektionsvolumen; der Mittelwert aller Versuchsgruppen beträgt $0,21 \pm 0,05 \text{ \%/h}$. Diese geringe Verlustrate kann durch eine verminderte Zelltodrate oder eine verminderte Eliminationsrate toter markierter Zellen verursacht sein.

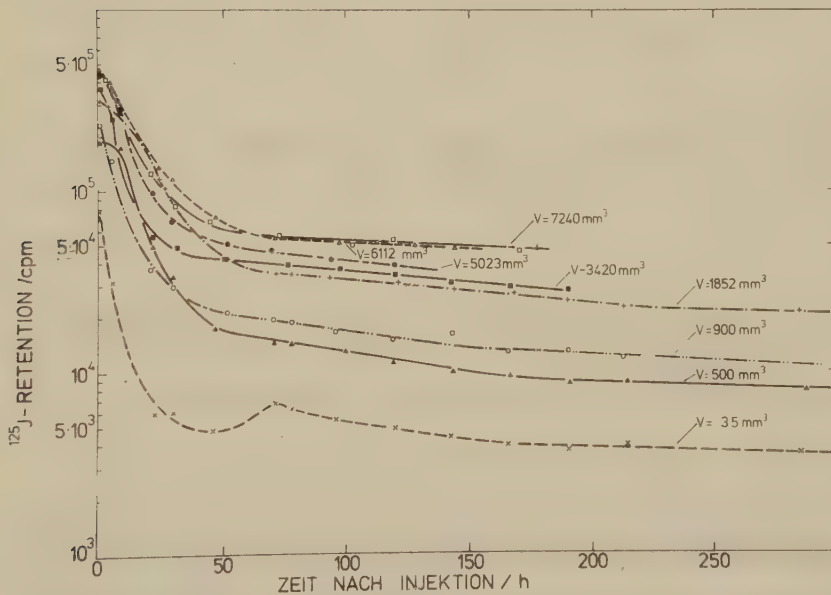


Abb. 4.7.b: ^{125}J -Retention im tumortragenden Bein bei verschiedenen Volumina des Carcinoms EO 771 als Funktion der Zeit nach Injektion.

Die im Bereich von 50 bis 175 Stunden nach Injektion berechneten Aktivitätsverlustraten sind als Funktion des Tumorummens zur Zeit der Injektion für drei verschiedene Versuche in Abbildung 4.7.c aufgetragen. Die Aktivitätsverlustrate sinkt von 0,55 %/h bei einem Tumorummen von 1000 mm^3 auf 0,15 %/h bei 7000 mm^3 ab. Experimente bewiesen, daß dieser Abfall nicht durch eine Zunahme der Hautaktivität bedingt ist.

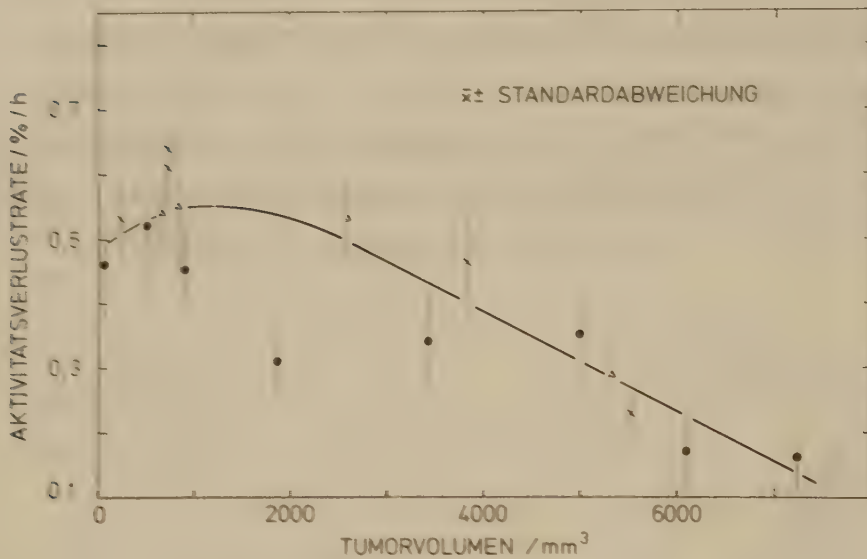


Abb. 4.7.c: Tumoraktivitätsverlustraten bei verschiedenen Tumorummina.

Abbildung 4.7.d zeigt die im Tumorgewebe eingebaute ^{125}J -Aktivität nach Injektion bei unterschiedlichen Tumorummina. Um die Bedingungen einer Pulsinjektion auch für große Tumoren zu gewährleisten, wurden diese Einbauwerte so korrigiert, als wenn bei allen Tumorummina 8 Prozent der ^{125}J -Aktivität, die 1 Stunde nach Injektion im Tumor vorhanden ist, inkorporiert werden (Kap. 4.5.). Der ^{125}J -Einbau pro mm^3 Tumorgewebe als

Maß der proliferativen Aktivität des Tumors fällt innerhalb eines kleinen Volumenbereichs schnell ab und erreicht bei größeren Volumina ein Plateau. Oberhalb eines Tumervolumens von 3000 mm^3 ändert sich der absolute ^{125}J -Einbau kaum noch.

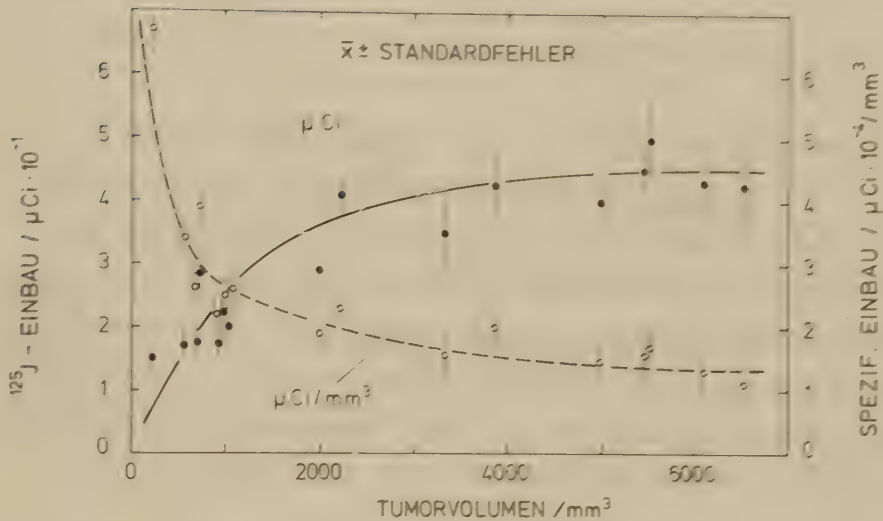


Abb. 4.7.d: Absoluter und spezifischer ^{125}J -Einbau im Tumorgewebe in Abhängigkeit vom Tumervolumen.

4.8. ^{125}J -Aktivitätsverteilung zwischen nekrotischem und vitalem Tumorgewebe

Mit Hilfe der Vitalfarbstoffe konnte die Aktivitätsverteilung zwischen vitalen und nekrotischen Tumorgebieten zu verschiede-

nen Zeiten nach Injektion von $20 \mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ bei zwei unterschiedlichen Tumorumfängen untersucht werden (Abb. 4.8.a, Kap. 3.8.).

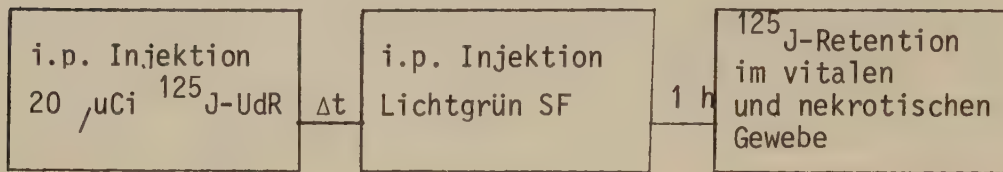


Abb. 4.8.a: Versuchsablauf

Beim kleinen ($V = 300 \text{ mm}^3$) und beim großen Tumorumfang ($V = 2949 \text{ mm}^3$) erfolgt der Einstrom markierter Zellen in die Nekrose mit einem Wert von $1,02 \text{ \%}/\text{h}$, die ^{125}J -Aktivität der Nekrose wird mit $0,26 \text{ \%}/\text{h}$ bzw. $0,14 \text{ \%}/\text{h}$ eliminiert (Abb. 4.8.b). Bei beiden Tumorumfängen sind 200 Stunden nach Injektion 76 Prozent der Gesamtaktivität in nekrotischen Bereichen lokalisiert. Die Aktivitätsverlustrate des vitalen Tumorgewebes beläuft sich auf $1,08 \text{ \%}/\text{h}$ ($V = 300 \text{ mm}^3$) bzw. $1,2 \text{ \%}/\text{h}$ ($V = 2949 \text{ mm}^3$).

Diese Ergebnisse zeigen, daß im Tumor Bereiche vorhanden sind, die eine unterschiedliche Kapazität interstitiellen Transports besitzen, und daß sich die Aktivitätsverteilung in den einzelnen Kompartimenten des Tumors mit der Zeit nach Injektion ändert.

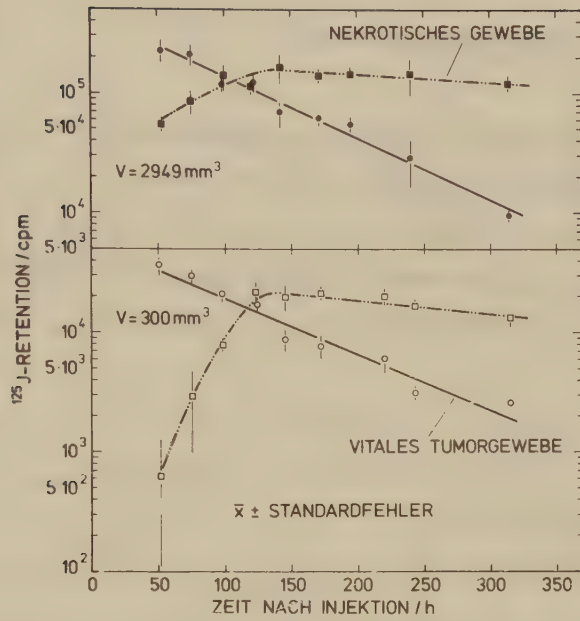


Abb. 4.8.b: ^{125}J -Retention des vitalen und des nekrotischen Tumorgewebes bei zwei unterschiedlichen Tumorvolumina als Funktion der Zeit nach Injektion.

4.9. Aktivitätsretention im Tumor nach Injektion toter markierter Zellen

4.9.1. In-vitro Markierung

Einer Gruppe gesunder Tiere und vier Gruppen mit Tumorträgern verschiedenen Volumens wurden ungefähr $1 \cdot 10^6$ abgetötete, mit ^{125}J -UdR markierte Tumorzellen in 0,1 ml isotonischer Kochsalzlösung an einer Stelle des gesunden Beins bzw. des Tumors injiziert. Die ^{125}J -Retention wurde am Tumormeßplatz gemessen (Kap. 3.9.).

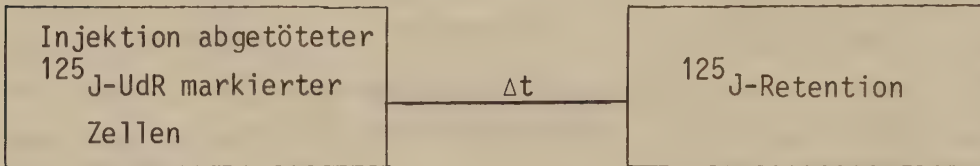


Abb. 4.9.a: Versuchsablauf

Die ^{125}J -Elimination nimmt mit steigendem Tumorumfang deutlich ab (Abb. 4.9.b). Die einzelnen Kurven zeigen einen doppelt exponentiellen Verlauf mit einer schnellen und einer langsamen Komponente, die bei den größeren Tumoren früher in Erscheinung tritt als bei den kleineren. Die Aktivitätsverlustraten der langsamen Komponente belaufen sich auf 0,37 %/h ($V = 225 \text{ mm}^3$), 0,41 %/h ($V = 750 \text{ mm}^3$), 0,36 %/h ($V = 3820 \text{ mm}^3$) und 0,41 %/h ($V = 5539 \text{ mm}^3$). Die Aktivität des gesunden Beins sinkt unter 1 Prozent der Anfangsaktivität ab, jedoch verringert sich auch hier die Geschwindigkeit der ^{125}J -Elimination im Laufe des Experiments.

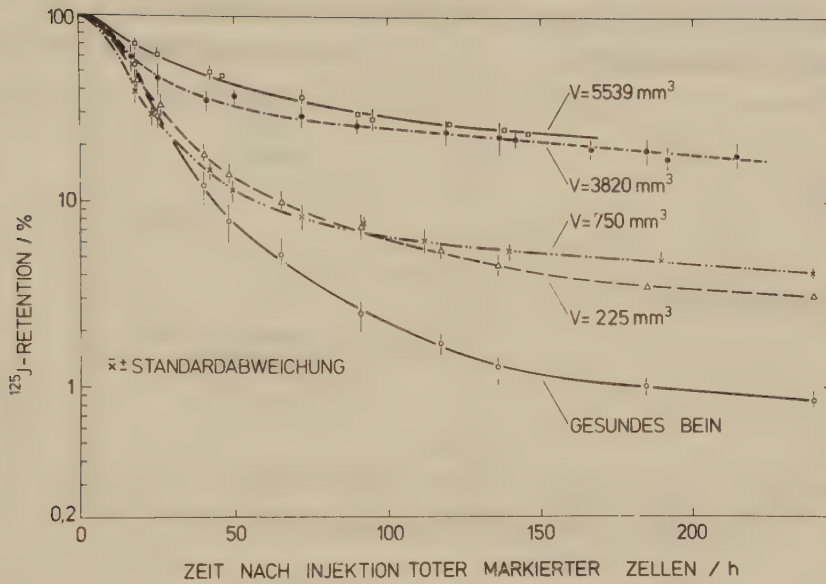


Abb. 4.9.b: ^{125}J -Retention als Funktion der Zeit nach Injektion toter, markierter Zellen.

Bei zwei verschiedenen Tumorumfängen ($V = 1100 \text{ mm}^3$ und $V = 6500 \text{ mm}^3$) wurde nach Injektion des Vitalfarbstoffs Lichtgrün die Verteilung der toten markierten Zellen im Tumor untersucht (Abb. 4.9.c). Beim kleineren Tumor wird der Kurvenverlauf in den ersten 60 Stunden durch die Aktivität in den vitalen Bezirken beherrscht, erst danach überwiegt die Aktivität in der Nekrose, weil diese während des Tumorwachstums an Ausdehnung zunimmt. Jedoch bei größeren Tumoren gelangt durch die Injektion die Aktivität von Anfang an in die Nekrose, da sie sich in den distalen Bereichen des tumortragenden Beins befindet und den größeren Teil des Tumorumfanges einnimmt.

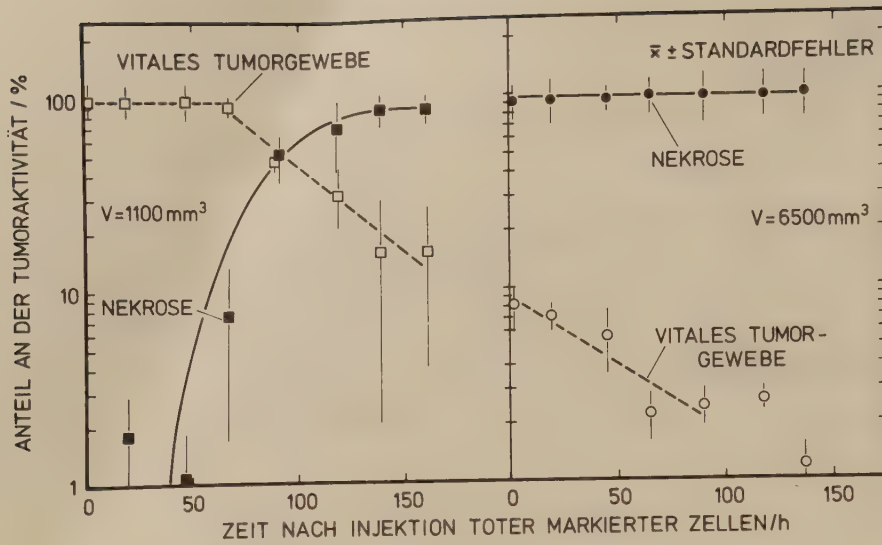


Abb. 4.9.c: Aktivitätsverteilung im Tumor nach Injektion toter markierter Zellen in Prozent der Gesamtaktivität zum jeweiligen Zeitpunkt.

Ein Teil der Tumortiere jeder Gruppe erhielt zusätzlich zu den abgetöteten, mit ^{125}J -UdR markierten Zellen jeweils $10 \mu\text{Ci}$ ^{131}J -UdR intraperitoneal injiziert, so daß gleichzeitig die Aktivitätselimination der toten, markierten Zellen und die Aktivitätsverlustrate am selben Tier bestimmt werden konnte.

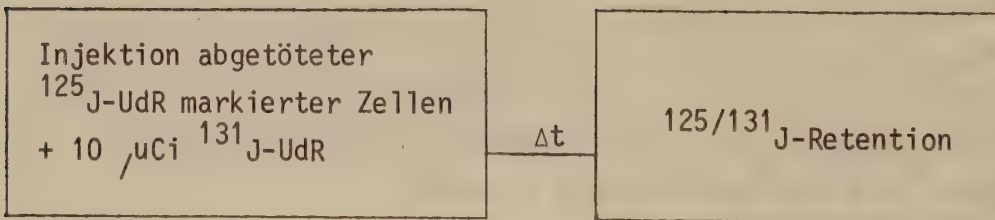


Abb. 4.9.d: Versuchsablauf

Auch hier nimmt bei größeren Tumoren die Aktivitätsverlust-rate nach intraperitonealer Injektion von Joddesoxyuridin ab, ebenso verschlechtert sich die Elimination der Aktivität aus den toten Zellen (Abb. 4.9.e).

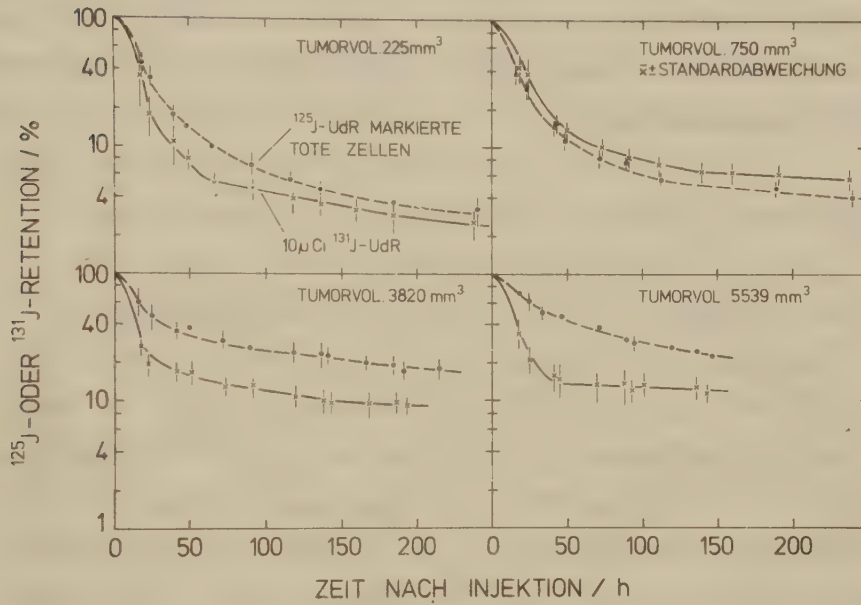


Abb. 4.9.e: Registrierung der Aktivitätsretention nach i.p. ¹³¹J-UdR-Injektion und nach intratumoraler Injektion ¹²⁵J-UdR markierter toter Zellen am gleichen Tier.

Bei einem Tumorumfang von 750 mm³ wurden außerdem noch 2 Gruppen mit jeweils 10 Tieren gebildet, denen 2 µCi Na¹²⁵J bzw. 2 µCi ¹²⁵J-UdR pro Maus in 0,1 ml Kochsalzlösung an einer Stelle des Tumors eingespritzt wurde. Die Aktivitätsretention der 4 Gruppen wurde am Tumormessplatz bestimmt.

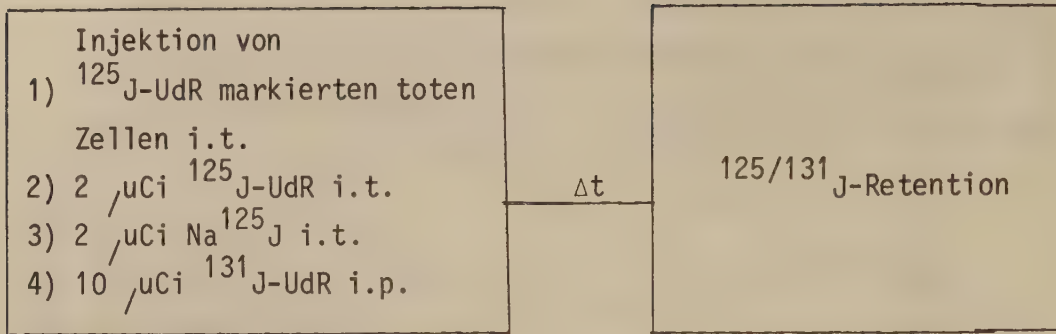


Abb. 4.9.f: Versuchsablauf

Die Tumoraktivität nimmt nach intratumoraler Injektion von $2\text{ }\mu\text{Ci Na } ^{125}\text{J}$ bis 30 Stunden nach Applikation mit einer Halbwertszeit von 4 Stunden ab. Auf diese schnelle Auswaschphase folgt eine langsame Aktivitätsabnahme ($T_{1/2} = 328$ Stunden). 50 Stunden nach Injektion sind 0,4 % der Anfangsaktivität im Tumor vorhanden. Nach intratumoraler Injektion von $2\text{ }\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ sind zum Zeitpunkt $t = 50$ Stunden 8,6 % im Tumorgewebe eingebaut. Die Tumoraktivität nimmt pro Stunde um $0,62 \pm 0,07$ % ab, nach intraperitonealer Injektion von $10\text{ }\mu\text{Ci } ^{131}\text{J-UdR}$ um $0,64 \pm 0,07$ % (Abb. 4.9.

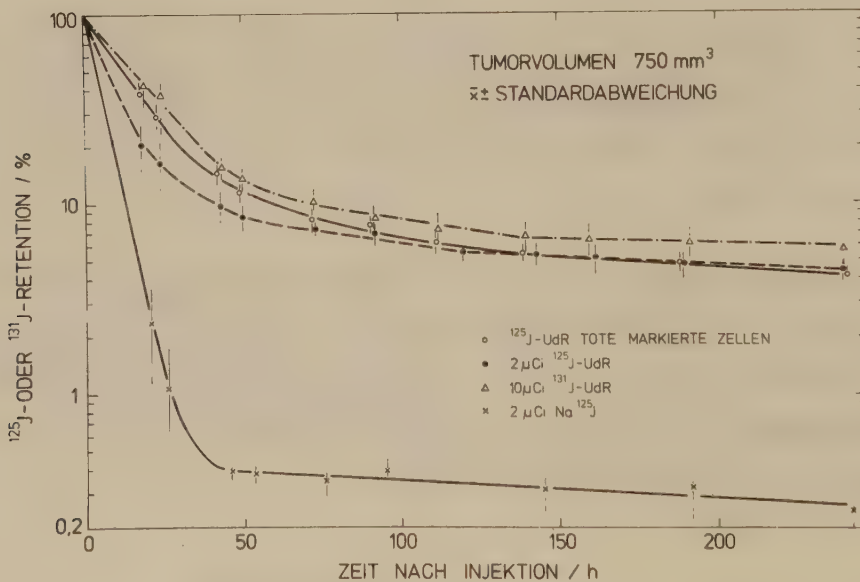


Abb. 4.9.g: J-Retention im Tumor nach intratumoraler Injektion von $2\text{ }\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$, $2\text{ }\mu\text{Ci Na } ^{125}\text{J}$ und $^{125}\text{J-UdR}$ markierter toter Zellen und nach intraperitonealer Injektion von $10\text{ }\mu\text{Ci } ^{131}\text{J-UdR}$.

4.9.2. In-vivo Markierung

Eine Suspension abgetöteter, in-vivo markierter Zellen wurde Tumoren unterschiedlichen Volumens injiziert. Die Suspension bestand aus einer Mischung von Zellen, die entweder nur ^3H -TdR oder nur ^{125}J -UdR eingebaut hatten (Kap. 3.9.). Zu verschiedenen Zeiten danach wurden jeweils drei Tiere pro Gruppe getötet und für die Messungen am Flüssigkeitsszintillationszähler aufgearbeitet (Friedrich, 1974). Die Ergebnisse wurden einzeln für beide Isotope dargestellt (Abb. 4.9.h).

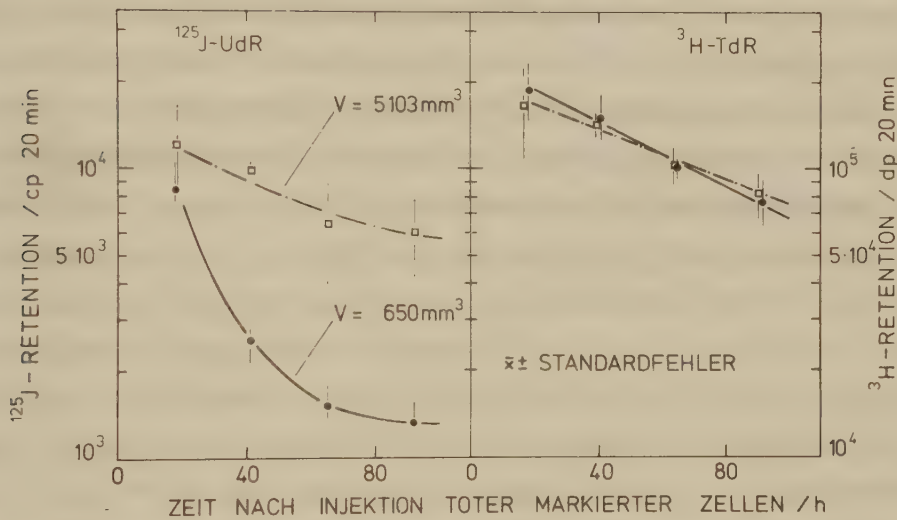


Abb. 4.9.h: Unterschiede in der Aktivitätselimination abgetöteter, mit ^{125}J -UdR oder ^3H -TdR markierter Zellen bei zwei Tumorgruppen.

Die ^{125}J -Retention zeigt den schon von der in-vitro Markierung her bekannten Verlauf (vergl. Abb. 4.9.b) mit einer Verlangsamung der Aktivitätsabnahme bei ansteigendem Tumorumfang. Dagegen unterscheiden sich die Kurven der ^3H -Retention bei beiden Tumorgruppen nur unwesentlich. Für größere Tumoren konnte schon gezeigt werden

(Abb. 4.9.c), daß durch die Injektion in den Tumor der überwiegende Anteil der Aktivität in nekrotische Gebiete gelangt, aus denen sie nur verzögert freigesetzt wird. Autoradiographische Untersuchungen wurden am vierten Tag nach Injektion abgetöteter, nur ^3H -TdR markierter Zellen bei den beiden Gruppen der gleichen Transplantationsserie durchgeführt. Die ^3H -TdR markierten Zellreste sind inhomogen über den ganzen Tumor verteilt; sie liegen in größeren Ansammlungen vor, während andere Tumorbereiche fast völlig frei von Aktivität sind. Zusammenhängende Bestandteile der einzelnen abgetöteten Zellen sind nicht mehr zu erkennen, es handelt sich nur noch um markierte Strukturen. Bei beiden Tumorgruppen, die zum Zeitpunkt des Tötens einen 10 bzw. 18 Tage alten Tumor trugen, ist ein Teil der Aktivität in den nekrotischen Bereichen vorhanden. Sie liegt hier hauptsächlich zwischen den pyknotischen Kernen, während sie im vitalen Tumorgewebe über den Zellen verteilt vorliegt. Sowohl im älteren als im jüngeren Tumor sind Kerne vitaler Zellen markiert.

5. Störmöglichkeiten der Bestimmung des Aktivitätsverlustes und ihr Einfluß beim Mammacarcinom E0 771

- 5.1. Hautaktivität
- 5.2. Nicht DNA-gebundene Radioaktivität
- 5.3. Einwanderung markierter Zellen
- 5.4. Toxizität des DNA-Vorläufers
- 5.5. Resorption nekrotischen Gewebes
- 5.6. Wiederverwertung

Die direkte und nicht-invasive Methode, den Zellverlust von Tumoren nach Markierung der Zellen mit ^{125}J -UdR zu ermitteln, eröffnet neue Möglichkeiten sowohl in klinischer als auch in zellkinetischer Hinsicht. Der Vorteil, Zellverluste an einem Tier über einen längeren Zeitraum zu messen, würde theoretisch ihre Anwendbarkeit bei zugänglichen menschlichen Neoplasmen begründen, da auch weniger radiotoxische Jodisotope als 125-Jod zur Verfügung stehen. Dadurch könnte die Effektivität einer Therapie exakter und früher als bisher erkannt werden. Auf zellkinetischem Gebiet ist unter anderem die Arbeitersparnis gegenüber der indirekten ^3H -TdR-Methode von Bedeutung, da bei ihr zeitaufwendige mikroskopische und autoradiographische Untersuchungen nötig sind. Bevor aber Aktivitätsverluste und Zellverluste einander gleichgesetzt werden, müssen Störfaktoren, die im folgenden näher erläutert sind, überprüft werden.

5.1. Hautaktivität

Die Einflüsse dieses Faktors sind wohl vernachlässigbar klein. Die

Subtraktion der Zählraten des gesunden Beins von denen des Tumorb eins verändert die Werte des relativen Aktivitätsverlustes nicht signifikant. Dies ist verständlich, da die Zählrate bei einem Tumolvolumen von 1852 mm^3 die des entsprechenden gesunden Beins um einen Faktor 9 bis 11 übertrifft. Somit wird auch ein Effekt von Seiten des Femurs weitgehend ausgeschlossen. Bei kleineren Volumina steigt der Anteil der Hautaktivität wohl an, aber auch hier finden Veränderungen der Aktivitätsverlustraten nur im Bereich der Standardabweichungen statt. Bei der Berechnung des ^{125}J -UdR-Einbaus, der einen absoluten und keinen relativen Wert darstellt, wurde die Aktivität des gesunden Beins jedoch subtrahiert, um einen Einfluß besonders bei kleinen Volumina zu eliminieren. Vergleiche zwischen der separat gemessenen Haut über dem Tumor und dem gesunden Bein zeigen, daß diese Art der Korrektur gerechtfertigt ist, da zwischen ihren Zählraten kaum Unterschiede bestehen. Auch beim C3H Mammacarcinom enthält die Haut über dem Tumor nur 3 bis 8 Prozent der Tumoraktivität im Zeitraum von 48 bis 120 Stunden nach ^{131}J -UdR-Injektion (Dethlefsen, 1971). Die Meßdaten können jedoch durch eine Ansammlung von markierten Entzündungszellen und toten Tumorzellen in ulcerierter Haut verfälscht werden (Begg, 1975). Ulcerationen treten beim Carcinom EO 771 jedoch erst bei größeren Volumina auf, die befallenen Tiere wurden vom Versuch ausgeschlossen.

5.2. Nicht DNA-gebundene Radioaktivität

Der überwiegende Anteil injizierten J-UdRs wird zu Jodid abgebaut. Da dieses Jodid sich schnell im interstitiellen Raum ausbreitet und dabei auch labil an Proteine gebunden werden kann, ist eine Korrektur der Aktivitätsverlustrate nötig, sobald der Anteil der nicht DNA-gebundenen Aktivität starke Schwankungen aufweist. Ein Einfluß läßt sich leicht durch Injektionen von Na^{125}J bzw. ^{131}J -UdR am gleichen Tier überprüfen. Dieses Vorgehen zeigt Übereinstimmung mit anderen Methoden, bei denen die DNA extrahiert wird (Begg, 1975; Hughes et al., 1964).

Daß dieser Artefakt eine Rolle spielen kann, zeigen Untersuchungen am CBA Sarkom F. Während der ersten fünf Tage nach Injektion von ^{125}J -Joddesoxyuridin steigt die Tumoraktivität stetig an, 15 Prozent der Zunahme lassen sich auf einen Anstieg der nicht DNA-gebundenen Aktivität zurückführen (Begg, 1977). Bei Tumoren, deren Aktivität jedoch mit der Zeit nach Injektion abnimmt, befinden sich mehr als 90% des inkorporierten J-UdR in der DNA-Fraktion, sobald das säurelösliche Material den Tumor verlassen hat. Dieser Anteil schwankt während des Versuchszeitraums nur gering, so daß Messungen der Tumoraktivität nach Injektion des markierten Thymidinanalogs den DNA-Verlust darstellen (Dethlefsen, 1969, 1971; Jenkinson et al., 1975; Porschen & Feinendegen, 1969, 1973). Auch in gesunden Geweben der Maus liegt der Anteil der DNA-Fraktion an der Gesamtaktivität zwischen 87 und 97 Prozent (Feinendegen et al., 1973).

Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen am Adenocarcinom EO 771, so daß auch hier Verluste ^{125}J -markierter Desoxyribonucleinsäure durch externe oder in-vitro Messungen erfaßt werden (Kap. 4.6). Prinzipiell ergeben sich keine Unterschiede in den Berechnungen, wenn sie mit den Daten nach intratumoraler oder intraperitonealer Injektion von 125- oder 131-Joddesoxyuridin durchgeführt werden (Abb. 4.9.g). Die schnelle Eliminationsgeschwindigkeit ($T_{1/2} = 4\text{h}$)

aus dem Tumor nach Injektion von radioaktiv markiertem Natriumjodid fügt sich gut in diese Beobachtungen ein und entspricht Versuchen beim Sarkom 180. Bei diesem Tumor stimmen die Anteile der DNA-Fraktion an der Gesamttumoraktivität nach Extraktion der DNA und nach Na¹²⁵J/¹²⁵J-UdR-Injektion überein (Porschen et al., 1979b).

Der starke Abfall der Tumorzählrate bis zu 50 Stunden nach intraperitonealer Applikation spiegelt die Elimination säurelöslichen Materials wider, das ungefähr 90 Prozent der Tumoraktivität eine Stunde nach Injektion umfaßt. Für das C3H Mammacarcinom gelten ähnliche Werte (Dethlefsen, 1969, 1971; Porschen & Feinendegen, 1969).

5.3. Einwanderung markierter Zellen

Spontanregression und vermehrtes Auftreten von Tumoren bei Immundefizienzen sind Hinweise auf immunologische Reaktionen von Seiten des Wirtes gegen entstehende Tumoren. Histologisch kann sich dies bei Tumoren in einer Infiltration durch Makrophagen und Lymphozyten zeigen (Bagshawe, 1975).

Das Sarkom 180 auf metastasensfreien NMRI-Mäusen verursacht eine Erhöhung der Ganzkörperaktivität nach ^{125}J -UdR-Injektion im Vergleich zu gesunden Tieren. 24 Stunden nach Applikation sind dafür hauptsächlich die Leber, die Milz und das Knochenmark verantwortlich. Eine gesteigerte Proliferationsrate in den genannten Organen wird aber auch durch spontan entstandene und durch syngene Tumoren hervorgerufen (Kronenberger et al., 1977). Diese erhöhte Proliferationsaktivität, die überwiegend das lymphatische und retikuloendotheliale System erfaßt, zeigt sich in Anwesenheit des syngenesischen Mammacarcinoms EO 771 in einem Anstieg des ^{125}J -Einbaus im Ganzkörper und im gesunden Bein von Tumorträgern.

Hinweise auf zelluläre Abwehrreaktionen können mit direkten Meßmethoden im Tumor selbst beobachtet werden. Die Zellverlustrate von Aszitestumorzellen, die mit ^{125}J -Joddesoxyuridin markiert sind, ist bedeutend höher, wenn sie in Mäuse injiziert werden, die gegen H-2 oder nicht-H-2 Antigene vorimmunisiert sind, als in den Kontrollen. Diese Beobachtung korreliert sehr eng mit der Tatsache, daß die sensibilisierten Tiere trotz der Tumorumplantation überlebten (Forman et al., 1972). Autoradiographische Untersuchungen am EMT6/M/AC Tumor zeigen, daß auf Mäusen, die mit Antilymphozytenserum (ALS) behandelt waren, das Wachstum des Tumors beschleunigt ist. Der Grund liegt darin, daß die Zellverlustrate des Tumors in den ALS-behandelten Tieren um ein Mehrfaches kleiner ist als in den Kontrollmäusen. Somit werden 60 bis 85 Prozent des

Zelltodes in ungestörten EMT6/M/AC Tumoren durch zellvermittelte Immunvorgänge bewirkt, was auch verständlich ist, da bei Tumorträgern in 3 bis 5 Prozent der Fälle eine Spontanregression eintritt. Erstaunlicherweise ist jedoch die "growth fraction" und die Zellproduktionsrate des Tumors in den ALS-behandelten Tieren erniedrigt, die Zellzykluszeit wird durch die Applikation von Antilymphozytenserum nicht beeinflusst (Watson, 1976b).

Bei Untersuchungen des Aktivitätsverlustes von Tumoren wird das injizierte J-UdR nicht nur in die Tumorzellen, sondern auch in die Wirtszellen eingebaut. Tumoren, deren Blutzufuhr während und 30 Minuten lang nach ^{125}J -UdR-Injektion unterbrochen wurde, weisen einen Aktivitätseinstrom auf, der vier Tage post injectionem 30 bis 40 Prozent der Aktivität von Tumoren beträgt, die den Tracer ungestört einbauen konnten. Ein solcher Einstrom kann beim minimal immunogenen RIF-1 Tumor nicht beobachtet werden, so daß die Aktivitätsanreicherung eher auf die Einwanderung markierter Wirtszellen als auf Wiederverwertung des DNA-Vorläufers im Tumor aus Geweben des Wirtes zurückzuführen ist (Franko & Kallman, 1979). Ein Einwandern von markierten Zellen braucht jedoch nicht nur auf Antigendifferenzen im Tumor-Wirt-System zu beruhen. Eine Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit 400 rad 24 Stunden vor der Tumorimplantation reduzierte den kontinuierlichen Aktivitätsanstieg bis zum fünften Tag nach Injektion von ^{125}J -desoxyuridin beim schon erwähnten CBA Sarkom F um ungefähr ein Drittel. Histologische Schritte enthüllten signifikante leukozytäre Infiltration in Tumoren von unbestrahlten Mäusen, aber keine in der bestrahlten Gruppe. Dieser Einstrom markierter Leukozyten wird hierbei durch Infektionen ulcerös veränderter Haut über den Tumoren verursacht, wobei auch die sich bildenden nekrotischen Zellen Phagozyten anlocken mögen. Eine Immunogenität des Tumors scheidet als Ursache aus, da es nicht gelingt, die CBA Mäuse gegen dieses Sarkom zu immunisieren (Begg, 1977).

Beim Sarkom 180 auf NMRI Mäusen, das in diesem Institut als Experimentaltumor verwendet wird, beobachtet man im Intervall von 50 bis 100 Stunden nach Injektion des markierten DNA-Vorläufers eine schulterförmige Erhöhung der Tumorzählrate. Diese "Schulter" ist nicht bei allen Tieren zu finden, was aber möglicherweise dadurch erklärt werden kann, daß es sich beim Wirtstamm nicht um inzuchtgezüchtete Mäuse handelt. Nach Pittner (1971) wird diese "Schulter" durch einwandernde markierte leukozytäre Wirtszellen bewirkt, deren Elimination diejenige der Tumorzellen überlagert. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Spontanregression des allogenen Sarkoms je nach Empfängerstamm zwischen 6 und 40% liegt und durch aktive Immunisierung mit abgetöteten Tumorzellen erhöht werden kann. Außerdem zeigt sich nach ^{125}J -UdR Applikation, die 24 Stunden vor der Tumorimplantation erfolgte und somit nur die Wirtszellen markiert, eine Zunahme der Aktivität im Tumor immunisierter Wirtstiere mit einem Maximum 70 Stunden nach Tumorimplantation (Bosco, 1973; Stecher et al., 1976). Nach Ganzkörperbestrahlungen von Empfängertieren verschiedener Stämme mit 400 R 24 Stunden vor Inokulation des Sarkoms 180 verschwindet die "Schulter" beim System C57BL/6J/S180, während sie beim System NMRI/S180 bestehen bleibt (Wießner, 1972). Somit läßt sich der Zählratenanstieg beim Sarkom 180 auf NMRI Mäusen möglicherweise nicht nur durch einwandernde Abwehrzellen erklären.

Beim Carcinom E0 771 wird eine Erhöhung der Zählrate jedoch nur bei einem sehr kleinen Volumen ($V = 35 \text{ mm}^3$, Tumoralter 3 Tage) bei allen Tieren dieser Versuchsgruppe zwischen 50 und 80 Stunden nach Injektion des radioaktiven Tracers beobachtet (Abb. 4.7.b). Eine Subtraktion der Zählrate des gesunden Beins von derjenigen des tumortragenden Beins beweist, daß das Tumorgewebe selbst für diesen Anstieg verantwortlich ist. Bei allen anderen Versuchsgruppen kommt dies nicht zum Ausdruck. Der Zeitraum stimmt gut mit dem Erscheinen markierter Granulozyten und Lymphozyten im Blut

überein (Feinendegen et al., 1966b; Gerecke et al., 1973; Pittner, 1971). Eine bakterielle Verunreinigung der Transplantationssuspension als Ursache für die Einwanderung der markierten Wirtszellen scheidet aus, da die Sterilitätskontrollen negativ verliefen. Die Abwehrvorgänge des Wirtes beschränken sich aber nicht nur auf die ersten Tage nach Tumorentplantation, sondern drücken sich auch noch in einem erhöhten ^{125}J -Einbau im Körper und im gesunden Bein von Tumorträgern mit 9 Tage alten Neoplasmen ($V = 1852 \text{ mm}^3$) aus, ohne daß sich ein Einfluß bei der entsprechenden Tumorretentionskurve zeigt. Dies spricht dafür, daß die Abwehrvorgänge im Tumor selbst in einem geringen Maße stattfinden und die Aktivität der wenigen einwandernden Zellen durch die bedeutend höhere Zählrate bei größeren Tumoren überdeckt wird. Diese Ansicht wird durch das extrem geringe Auftreten von Entzündungszellen und Makrophagen auch bei größeren Tumoren mit einem hohen Nekroseanteil unterstützt. Wenn der Einstrom markierter Zellen bei allen Versuchsgruppen in gleichem Maße erfolgt, hat die Zunahme der Zählrate (1900 cpm) einen Anteil von ungefähr 12 % ($V = 500 \text{ mm}^3$) bzw. 3 % ($V = 7240 \text{ mm}^3$) an der Zählrate der Tumorgruppen 50 bis 80 Stunden nach Injektion; ein Prozentsatz, der innerhalb der statistischen Streuung dieser Gruppen liegt. Ein Aktivitätsanstieg 50 bis 80 Stunden nach Injektion tritt auch nicht im vitalen Gewebe verschieden großer Tumoren auf. Der unbedeutende Einfluß einwandernder, markierter Abwehrzellen auf die Bestimmung des Aktivitätsverlustes beim syngenesischen Adenocarcinom E0 771 schlägt sich auch in der geringen TD_{50} und der fehlenden Spontanregression nieder.

5.4. Toxizität des DNA-Vorläufers

Untersuchungen biologischer Parameter mit Hilfe von markiertem Joddesoxyuridin können sowohl durch chemische als auch durch physikalische Toxizität dieses DNA-Vorläufers beeinflusst werden.

Bei den Toxizitätsüberprüfungen betrug die spezifische Aktivität 32,32 Ci/mMol ($\hat{=}$ 91,3 μ Ci/ μ g). Jedem Tier wurden 0,55 μ g J-UdR ($\hat{=}$ 0,00155 μ Mol) intraperitoneal injiziert, wovon ungefähr 0,93 % in einem 0,725 g schweren Tumor eingebaut werden. Bei Berücksichtigung der zellkinetischen Parameter (König, 1978) und unter der Annahme, daß die Desoxyribonucleinsäure (2 bis 5 mg/g Frischgewebe) zu 30 % aus Thymidin besteht, kann man berechnen, daß im Tumorgewebe ungefähr $3 \cdot 10^{-3}$ % des Thymidins durch Joddesoxyuridin ersetzt werden. Um aber toxische Effekte auf das Wachstum in-vitro zu erreichen, muß J-UdR mehr als 1 % des Thymidins ersetzen (Begg, 1975; Feinendegen et al., 1966b; Post & Hoffman, 1969). Toxische Effekte durch eingebautes unmarkiertes J-UdR sind somit bei den durchgeführten Experimenten unwahrscheinlich; besonders, weil die spezifische Aktivität im Verlauf dieser Untersuchung durch die Lieferfirma noch erhöht wurde. Diese Berechnungen stimmen mit der Tatsache überein, daß intraperitoneale Injektionen von 0,55 μ g kaltem J-UdR die Überlebenszeit tumortragender Mäuse gegenüber den Kontrollen nicht verändern. Auch die Daten von Dethlefsen (1974), daß der J-UdR-Einbau in die Tumor-DNA erst oberhalb von 0,2 μ Mol/Maus gehemmt wird, schließt eine Beeinflussung metabolischer Prozesse durch die chemische Toxizität von J-UdR beim Adenocarcinom EO 771 innerhalb des verwendeten Dosisbereiches aus.

Radiotoxische Einflüsse können sich in einer Erhöhung der Aktivitätsverluste oder einer Veränderung des Tumorstwachstums zu erkennen geben. Der Kurvenverlauf der Ganzkörperretention scheint den geringsten Effekt nach Injektion von 20 μ Ci 125 J-UdR zu zeigen. Die

Kurven nach Injektion von 10 und 50 μCi $^{125}\text{J-UdR}$ verlaufen im Anfangsbereich etwas steiler, später als 150 Stunden nach Applikation ist der Abfall bei allen drei Dosen jedoch ähnlich. Die Unterschiede sind jedoch nicht bedeutend, wenn man berücksichtigt, daß der relative Fehler des Mittelwertes zwischen 9 und 13 Prozent liegt und bei der Berechnung die Streuung der Meßdaten bei 50 Stunden nach Injektion nicht berücksichtigt ist. Der Trend, daß 20 μCi $^{125}\text{J-UdR}$ die kleinste Wirkung hervorruft, deutet sich möglicherweise auch in den Überlebenszeiten der tumortragenden Mäuse an, obwohl die Differenzen zwischen den radioaktiv markierten Gruppen nicht signifikant sind. In einem anderen Versuch, der zur Überprüfung der Ergebnisse angesetzt wurde, überlebten die tumortragenden Mäuse nach Injektion von 20 μCi $^{125}\text{J-UdR}$ ($n = 15$) $22,9 \pm 6,4$ Tage gegenüber $24,6 \pm 7,3$ Tage bei den Kontrollen ($n = 26$; $p > 20\%$), ein noch geringerer, nicht signifikanter Unterschied als im Hauptversuch. Andere Untersuchungen zeigen, daß bei 20 μCi $^{125}\text{J-UdR}$ ($2,5 \mu\text{g}$ J-UdR) die Ganzkörperelimination des Tracers $^{131}\text{J-UdR}$ derjenigen der Kontrolle entspricht, während sie bei höheren bzw. niedrigeren $^{125}\text{J-UdR}$ -Dosen beschleunigt bzw. verzögert ist. Dies wird auf das Absinken der Zellproliferation mit steigender Dosis und die überwiegende Rolle des Zelltods in höheren Dosisbereichen zurückgeführt (Ertl, 1970, Feinendegen et al., 1971).

Die DNA-Synthese ist bei allen Gruppen proportional der angebotenen Menge. Ein Einfluß von $^{125}\text{J-UdR}$ auf die Zellproliferation ist nicht vorhanden. Die Steigung der Geraden in Abb. 4.3.d beträgt 0,922 (Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,999$) und entspricht damit fast der theoretischen Steigung 1. Diese Befunde wurden auch beim C3H Mammacarcinom und bei Knochenmarkszellen erhoben (Dehtlefsen, 1969; Giesen, 1970).

5 bis 50 μCi $^{125}\text{J-UdR}$ induzieren keinen Zelltod, da das Wachstum und die Aktivitätsverluste der Tumoren in den verschiedenen Gruppen

einander entsprechen. Dies trifft auch für das MTG-B Mammacarcinom und das Sarkom 180 zu (Clifton & Yatvin, 1970; Schwarting, 1973/74). Beim Carcinom NT und beim CBA Sarkom F erhöhen sich die Aktivitätsverluste jedoch bei Dosen über 10 bzw. 20 $\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$, während sich Wachstumsveränderungen erst bei höherer Dosierung zeigen. Die J-UdR-Technik ist also empfindlicher als die Bestimmung des Tumolvolumens (Begg, 1975). Bei einer Wachstumsfraktion von 90 % und einem Anteil der S-Phase am Zellzyklus von 33 Prozent (König, 1978) kann die eingebaute Aktivität pro Million Zellen beim Adenocarcinom EO 771 ermittelt werden. Nach intraperitonealer Gabe von 50 $\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ werden $4,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{Ci}/10^6$ Zellen inkorporiert. Dies liegt weit unter dem toxischen Grenzwert von 0,02 bis 0,025 $\mu\text{Ci}/10^6$ Zellen, den Hofer et al. (1969, 1970) für verschiedene Aszitestumoren angibt. Die LD_{50} für eingebautes ^{125}J bei diesen Tumoren beträgt vier Zerfälle / Stunde und Zelle (Hofer & Hughes, 1971). Aus der eingebauten $^{125}\text{J-UdR}$ -Menge ergeben sich 0,56 Zerfälle / Stunde und Zelle beim Carcinom EO 771. Da außerdem die übliche Dosierung 20 $\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ / Maus betrug, sind Verfälschungen der Meßdaten infolge der Radiotoxizität des Jodisotops sicher auszuschließen. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Aktivitätsverlusten nach intraperitonealer Injektion von 10 $\mu\text{Ci } ^{131}\text{J-UdR}$ denjenigen anderer Versuche entsprechen, bei denen 20 $\mu\text{Ci } ^{125}\text{J-UdR}$ verabreicht wurde, obwohl ^{131}J bedeutend weniger radiotoxisch ist als ^{125}J (Hofer & Hughes, 1971).

Zusammenfassend läßt sich vermerken, daß die Experimente und Berechnungen sowohl eine chemische als auch eine Radiotoxizität in den erwähnten Dosierungen ausschließen. Die gemessenen Aktivitätsverlusten sind somit kein Ausdruck eines induzierten Zelltodes.

5.5. Resorption nekrotischen Gewebes

Ab einer gewissen Größe bilden sich in vielen Experimentaltumoren nekrotische Bereiche, deren Ausmaß je nach Tumorschwankt (Begg, 1977; Caspersson & Santesson, 1942; Cooper, 1973, Dunham & Stewart, 1953; Erbe et al., 1977; Inch & McCredie, 1968; Schatten, 1962; Spencer & Lang, 1976). Ihre Resorptionsgeschwindigkeit hat einen großen Einfluß auf das Wachstum und damit auf die Kinetik des Gesamttumors. Die Abhängigkeit der extern bestimmten Aktivitätsverlustrate von der Elimination abgestorbener markierter Zellen wurde nach Injektion des Vitalfarbstoffes Lichtgrün SF überprüft. Die Aufnahme des Farbstoffes entspricht dem Blutfluß im Tumorgewebe und eine fehlende Anfärbung signalisiert Ansammlungen toter Zellen (Goldacre & Sylvén, 1959, 1962; Lewis et al., 1968; Rogers et al., 1967).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Resorption der zugrunde gegangenen Zellen nur langsam mit einer durchschnittlichen Rate von 0,2 %/h (0,26 %/h für $V = 300 \text{ mm}^3$ und 0,14 %/h für $V = 2949 \text{ mm}^3$) erfolgt. Eine Volumenabhängigkeit dieses Wertes kann daraus nicht abgeleitet werden. Beim subkutan implantierten Ehrlich Carcinom (Lala, 1972) vermindert sich die Beseitigung nekrotischen Gewebes jedoch von 0,68 %/h ($V = 300 \text{ mm}^3$) auf 0,42 %/h ($V = 2400 \text{ mm}^3$). Dieser schleppende Abtransport markierter toter Zellen deckt sich mit den histologischen Beobachtungen, daß die Phagozytoseaktivität beim Carcinom EO 771 extrem gering ausgeprägt ist und nur selten Zonen mit völlig aufgelösten Zellstrukturen vorhanden sind, die abgestorbenen Zellen aber meistens einen pyknotischen, zusammengesinterten Kern enthalten. Dieses "Liegenbleiben" erstreckt sich nicht nur auf markierte Desoxyribonucleinsäure, sondern auch auf Farbstoffe, die in das nekrotische Gewebe injiziert werden, und auf markierte Proteine (Goldacre & Sylvén, 1962; Reid & White, 1959).

Somit ist der interstitielle Transport in diesen Arealen herabgesetzt. Dies gilt womöglich nicht für alle Tumoren. Tannock (1968, 1970) berechnete, daß im BICR/SA1 Adenocarcinom (100. Transplantationsgeneration) fast kein nekrotisches Material abtransportiert wird, während es beim C3H Mammacarcinom (4. Generation) um 3,5 %/h verringert wird. Dies ist plausibel, da auch der durchschnittliche Anteil des nekrotischen Gewebes am Gesamttumor bei beiden Tumoren mit 65 zu 27 Prozent um ein Mehrfaches differiert. Eventuell läßt sich dieser Unterschied mit der unterschiedlichen Transplantationsdauer erklären. Mit zunehmender Transplantationsgeneration steigt der nekrotische Prozentsatz an, was auch für C3H Tumoren nachgewiesen wurde (Begg, 1971; McCredie et al., 1971), bis sich die Fähigkeit des Tumors, absterbende Zellen zu entfernen, möglicherweise ab einem gewissen Grenzwert erschöpft. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß bei schon länger transplantierten Tumoren der Blutfluß während des Tumorwachstums absinkt (Robert et al., 1967), wodurch gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit des Zelltods erhöht, die der Beseitigung abgebauten Zellmaterials aber vermindert wird (Cooper, 1973). Auch beim Mammaadenocarcinom handelt es sich um einen häufig transplantierten Tumor (Kap. 4.1.).

Der Übergang markierter Zellen vom vitalen in den nekrotischen Bereich erfolgt volumenunabhängig mit einer Rate von 1,02 %/h. Beim kleineren Volumen umfaßt die nekrotische Aktivität 50 Stunden p.i. erst 1,6 Prozent der Tumoraktivität gegenüber 20 Prozent beim größeren Tumor, bei dem zum Zeitpunkt der ¹²⁵J-UdR-Applikation aber ungefähr nur noch 70 % vitales Gewebe vorliegt. Dieser Unterschied ist nicht verwunderlich, da der Markierungsindex nekrose-naher Zellen 10 bis 30 % beträgt (Brammer, 1976; Hirst & Denekamp, 1979; Tannock, 1968, 1970). Der Einstrom vitaler Zellen in die schlecht versorgten Bereiche geht auch bei anderen Tumoren rasch vor sich (Bosiljanoff et al., 1977; Goldacre & Sylvén, 1962;

Szczepanski & Trott, 1975; Tannock, 1970). In gut strukturierten Mammacarcinomen, in denen Zelltod nur durch Übergang in nekrotische Bereiche hervorgerufen zu werden scheint, benötigen Tumorzellen ungefähr 36 Stunden, um die Distanz von 90 μ m vom Blutgefäß zur vitalen Grenze zurückzulegen (Hirst & Denekamp, 1979; Tannock, 1968). Die histologische Beobachtung, daß die Zellkerne mäßig und das Zytoplasma deutlich beim Einstrom in die Nekrose schrumpfen (die ganze Zelle um schätzungsweise einen Faktor 2), findet ihre Bestätigung in den Angaben von Clifton & Yatvin (1970), daß die spezifische Aktivität der DNA in der Nekrose nach ^{125}J -UdR-Injektion um 45 % höher liegt als im vitalen Gewebe.

Der Aktivitätsverlust vitalen Tumorgewebes als Maß des Zellverlusts beläuft sich auf 1,08 bis 1,20 %/h und stimmt in der Größenordnung gut mit Werten überein, die autoradiographisch für Tumorzellpopulationen ermittelt wurden (Tab. 2.2.3.).

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind von grundlegender Bedeutung für das Verständnis und die Interpretation der extern gemessenen Aktivitätsverlustrate. Nach Injektion des markierten Thymidinanalogons lassen sich die in-situ gemessenen Retentionskurven bei kleinen Tumorumfängen in 2 Abschnitte unterteilen, die unterschiedliche Aktivitätsverlustraten aufweisen (Abb. 3.6.b, 4.7.b). Der Verlauf der zweiten, langsameren Komponente, die ungefähr ab 150 bis 170 Stunden nach Injektion auftritt, wird durch die Aktivität im nekrotischen Gewebe bestimmt, die zu diesem Zeitpunkt rund 70 Prozent der Tumoraktivität einnimmt und bis auf über 80 Prozent bei 250 Stunden p.i. ansteigt. Der extern ermittelte Wert von $0,21 \pm 0,05$ %/h stimmt gut mit der direkt gemessenen Eliminationsrate nekrotischen Materials von 0,14 bis 0,26 %/h überein. Auch bei diesen Versuchsgruppen ergab sich keine Volumenabhängigkeit. Einige Autoren (Begg, 1977; Okumura et al., 1973) ziehen aus der Beobachtung, daß der Aktivitätsverlust ab einem gewissen Zeitraum

nach Markierung der Tumorzellen mit ^{125}J oddesoxyuridin abnimmt, die Schlußfolgerung, daß sich die Zellverlustrate mit steigendem Tumolvolumen verringert. Die verwendeten Tumoren weisen aber auch einen nekrotischen Anteil auf, so daß sich aus dieser Beobachtung keine Aussage über den Zellverlust der Neoplasmen machen läßt, weil diese sich verzögernde Abnahme durch das stark markierte nekrotische Gewebe hervorgerufen wird.

Die Aktivitätsverlustrate von kleinen Tumoren, die zum Zeitpunkt der Injektion noch keine nekrotischen Bereiche aufweisen, ist höher als bei Tumoren, bei denen sich die Tumoraktivität schon von Beginn der Messung auf nekrotische und vitale Zellen verteilt (Abb. 4.7.c). Der Einfluß der nekrotischen markierten Zellen steigt während des Tumorwachstums noch an, da sich der Anteil der Nekrose am Tumolvolumen vergrößert und somit die Kontaktfläche zwischen vitalem und abgestorbenem Gewebe vermehrt wird. Deshalb entsprechen die bei 5500 bis 7250 mm³ großen Tumoren extern gemessenen Aktivitätsverlustraten auch nahezu den Eliminationsraten toten Tumorgewebes.

Die Aktivitätsverlustrate als Funktion des Tumolvolumens beim Sarkom 180 zeigt einen relativ konstanten Verlauf (Sommer, 1976), obwohl bei diesem Tumor ein höherer Nekroseanteil als beim Adenocarcinom E0 771 vorliegt, die extern gemessenen Verlustraten um einen Faktor 2 bis 3 unter den autoradiographisch bestimmten liegen (Tab. 2.2.3.), abgestorbene Zellen nicht schneller abgebaut werden (Porschen et al., 1979b) und auch eine ^{125}J -Retentionskurve mit zwei Anteilen aufweist (Porschen et al., 1978). Auch Jenkinson et al. berichten von einer Zunahme der in-situ gemessenen Aktivitätsverlustrate während des Wachstums subcutan und intramuskulär implantierter Ehrlich Aszites Tumoren. Der untersuchte Größenbereich von 0,5 bis 7 mm Durchmesser (ungefähr $5 \cdot 10^{-2}$ bis 300 mm³) ist möglicherweise zu gering (Abb. 4.7.c), um endgültige Aussagen für diesen Tumor zu machen, obwohl sich hierbei schon sehr früh nekrotische Be-

reiche entwickeln.

Somit läßt sich folgern, daß der fehlende Abbau pyknotischer Zellen die Verwendung der extern gemessenen Aktivitätsverlust-rate als Hinweis auf das Ausmaß des Zelltods beim Adenocarcinom E0 771 stark beeinträchtigt. Der Satz von Commerford (1965), daß die Desoxyribonucleinsäure nur bei Zelltod verloren geht, trifft diesmal nicht zu und muß für jeden Tumor von neuem überprüft werden.

5.6. Wiederverwertung

Verglichen mit Thymidin, stellt die geringfügigere initiale Verwertung von Joddesoxyuridin einen Vorteil dar, weil proportional die Wiederverwertung aus absterbenden Zellen begrenzt sein sollte. Deshalb entspricht das Verhältnis der Aufnahme $^3\text{H-TdR}/^{125}\text{J-UdR}$, das in verschiedenen gesunden Geweben von Mäusen und Ratten gewöhnlich zwischen 2 und 8 liegt, in erster Linie dem Verhältnis der Wiederverwertung dieser beiden Vorläufer. Das Ausmaß der TdR Wiederverwertung kann bis auf 67 % ansteigen (Baugnet-Mahieu & Goutier, 1968; Dethlefsen, 1970; Feinendegen et al., 1966a, 1973; Heininger et al., 1970).

In Tumoren kann die hohe Wiederverwertung von $^3\text{H-TdR}$ die direkte Messung des Aktivitätsverlustes verhindern (Steel, 1966). Der wiederverwertete Anteil kann aus absterbenden Zellen des Tumors selbst oder aus markierten Geweben des Wirtstieres stammen, in überwiegendem Maße aus dem Darmepithel (Clifton & Cooper, 1973). Die externe Wiederverwertung aus gesunden Wirtszellen führt sogar zu einem Anstieg der Tumoraktivität mit der Zeit nach $^{125}\text{J-UdR}$ Injektion. Die interne Reutilisation aus Tumorzellen stört besonders bei Tumoren mit einem hohen Zellverlustfaktor, da die in-situ gemessene Geschwindigkeit des Aktivitätsverlustes vermindert werden kann (Begg, 1977).

Für das Adenocarcinom EO 771, das einen hohen Zellverlustfaktor besitzt und dessen Zählrate im gesamten als auch im vitalen Tumorgewebe mit der Zeit nach $^{125}\text{J-UdR}$ Verabreichung abfällt, wurde der Einfluß der internen Wiederverwertung durch Injektion toter markierter Zellen in unmarkierte, verschieden große Tumoren untersucht. Dabei ist es für das Ausmaß der Exkretion markierter Abbauprodukte unerheblich, ob die Zellen durch Bestrahlung oder durch Erhitzen bei verschiedenen Temperaturen abgetötet (Hofer et al., 1969; 1970; 1974) und ob sie in-vitro oder in-vivo mit verschiedenen

Dosen von $^{125}\text{J-UdR}$ markiert werden. Die herabgesetzte Elimination markierter abgetöteter Zellen bei größeren Tumoren täuscht eine starke Wiederverwertung nur vor, da der überwiegende Teil der Suspension in die nekrotischen Bereiche injiziert wird, aus der die markierten Abbauprodukte nur verzögert mit einer Rate von ungefähr 0,39 %/h freigesetzt werden. Dieser Zahlenwert ist ungefähr doppelt so groß wie derjenige für die Elimination abgestorbener Zellen nach i.p. Injektion, weil durch das Erhitzen die Zellstrukturen schon aufgelöst sind, während sonst die Zellkerne als zusammengesinterte, pyknotische Masse vorliegen und nur langsam einem völligen nekrotischem Abbau unterworfen sind. Die Halbwertszeit der schnellen Komponente nach Injektion toter markierter Zellen unterscheiden sich mit 18 zu 22 Stunden im vitalen Gewebe kleiner bzw. großer Tumoren nur geringfügig, so daß eine zunehmende Wiederverwertung als Ursache für die abfallende, extern gemessene Aktivitätsverlustrate nicht in Frage kommt. Auch aus der Differenz zum Abtransport im gesunden Bein ($T_{1/2} = 11 \text{ h}$) läßt sich keine erhöhte Wiederverwertung im vitalen Tumorgewebe ableiten, da die Suspensionslösung in die Muskulatur des Beins injiziert wurde. Die Muskulatur zählt zu den nicht-proliferierenden Geweben, so daß eine Reutilisation von $^{125}\text{J-UdR}$ praktisch nicht vorkommt (Heininger et al., 1970; Hughes et al., 1964). Der in der Muskulatur gegenüber den untersuchten Tumorumfängen höhere Blutfluß (Robert et al., 1967) verursacht demnach die beobachtete Differenz. Der Einfluß einer Wiederverwertung von Seiten des Knochenmarks auf die gemessene Halbwertszeit im gesunden Bein ist möglicherweise unbedeutend, da die Halbwertszeit der Aktivität im Femur nach intravenöser $^{125}\text{J-UdR}$ Injektion rund 50 Stunden beträgt (Feinendegen et al., 1973; Kronenberger et al., 1977).

Untersuchungen mit einer Mischsuspension aus abgetöteten, $^3\text{H-TdR}$ bzw. $^{125}\text{J-UdR}$ markierten Zellen bestätigen den geringen Einfluß der $^{125}\text{J-UdR}$ Reutilisation auf die Aktivitätsverlustrate des Adenocarcinoms E0 771. Besonders bei kleinen Tumoren tritt der Unter-

schied zwischen beiden Isotopen stark hervor, da bei großen Tumoren der Anteil der nekrotischen Aktivität die ^3H -TdR Wiederverwertung überlagert. Dieser Unterschied kann nicht durch einen veränderten Abtransport erklärt werden, da beide Tracer am gleichen Tier gemessen wurden. Auf Autoradiographien weisen vitale markierte Zellen darauf hin, daß dafür die ^3H -TdR-Reutilisation verantwortlich ist. Dies stimmt mit Ergebnissen von Friedrich (1974) überein, wonach auch bei Tumoren der Thymidineinbau demjenigen von Joddesoxyuridin um einen Faktor 5 überlegen ist.

Literaturangaben bestätigen die geringe Beeinflussung der Aktivitätsverlustenmessung durch die ^{125}J -UdR Verwertung aus sterbenden markierten Zellen (Clifton & Yatvin, 1970; Forman et al., 1972; Hofer et al., 1969). Für das Adenocarcinom zeigt sich dies nicht nur bei den Untersuchungen nach intratumoraler Injektion von Tumorzellen, sondern ergibt sich auch aus der Tatsache, daß ein großer Teil des Zelltods durch den Übergang in die Nekrose hervorgerufen wird und damit die inkorporierte Aktivität dieser Zellen dem Zugriff der Wiederverwertung weitgehend entzogen ist.

Das Ausmaß der Reutilisation kann quantitativ nur schwer aus den Retentionskurven nach Injektion toter Zellen abgeleitet werden. Eine Abschätzung erlaubt der Anteil, der von der Aktivität eingebaut wird, die 1 Stunde nach i.p. Injektion im Tumor vorhanden ist (Kap. 4.5.). Dieser Wert stimmt nach intraperitonealer und intratumoraler Verabreichung gut überein, wenn man den Beitrag der Hautaktivität bei i.p. Injektion berücksichtigt (Abb. 4.9.g), so daß er nur unbedeutend vom Katabolismus des DNA-Vorläufers beeinflusst wird. Abb. 4.5.c zeigt, daß der relative Einbau ansteigt, sobald im Tumor Nekrosebereiche entstehen. Eine Abtrennung grün angefärbter von ungefärbten Arealen 14 Tage alter Tumore 1 Stunde nach i.p. Injektion von ^{125}J -UdR ergab, daß die Zählrate im vitalen Teil 119604 ± 18066 cpm/g Tumorgewebe gegen-

über 100262 ± 4200 cpm/g in der Nekrose betrug. Da die Aktivität in der distal gelegenen Nekrose nicht verwertet wird und bei ihrer Elimination das vitale Tumorgewebe passieren muß, können bei größeren Tumoren wegen der längeren Verweildauer der Aktivität Zellen aus der G_1 -Phase in die S-Phase übertreten und den Vorläufer einbauen, wodurch der relative Einbau erhöht wird. Ob dieser Effekt jedoch den wiederverwerteten Anteil der Aktivität erhöht, ist zweifelhaft, da bei größeren Tumoren die eingebaute Aktivität pyknotisch gewordener Zellen nur geringfügig abgebaut wird und somit den Verhältnissen nach i.p. Applikation nicht entspricht. Der Effekt hat jedoch möglicherweise Auswirkungen auf die Form der PLM-Kurve.

Als Resultat bleibt festzuhalten, daß die abfallende, extern gemessene Aktivitätsverlustrate als Funktion des Tumorumfanges nicht mit einem Anstieg der Wiederverwertung erklärt werden kann und daß die Aktivitätsverlustratenmessung beim Carcinom E0 771 nur unwesentlich von der Wiederverwertung des Thymidinanalogs beeinflusst wird, da diese unterhalb von 10 Prozent liegt. Entsprechende Verhältnisse liegen auch bei anderen Mammatumoren vor (Dethlefsen, 1970).

6. Berechnung zellkinetischer Parameter und Tumorwachstumsbetrachtungen

Proliferierende Zellen bauen markierte DNA-Vorläufer in der S-Phase des Zellzyklus ein. Der Betrag der DNA-Syntheseaktivität kann aus dem Einbau des Thymidinanalogons Joddesoxyuridin während verschiedener Phasen der Tumorentwicklung abgeleitet werden, womit der Einbau pro Gewichtseinheit Tumorgewebe eine relative Aussage über die Anzahl der proliferierenden Zellen erlaubt (Dethlefsen, 1971; Henrichs, 1979; Hofer & Hughes, 1970; Mak & Till, 1963; Porschen et al., 1970). Von diesen Tatsachen ausgehend, wurde beim Carcinom EO 771 versucht, die "growth fraction" GF und Volumenverluste des vitalen Tumorteils aus einer kombinierten Analyse der relativen Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}/V$ und des ^{125}J -UdR Einbaus pro Volumeneinheit des vitalen Tumorgewebes quantitativ zu berechnen.

In diese Überlegungen gehen folgende Annahmen ein:

- 1) Das vitale Tumolvolumen V_{P+Q} setzt sich aus proliferierenden (P) und ruhenden (Q) Zellen zusammen, die beide ein gleiches, mittleres Zellvolumen besitzen.
- 2) Volumenverluste der vitalen Zellpopulation können für P-Zellen via l_1 in die Maus und für Q-Zellen via l_2 und l_3 in die Maus bzw. die Nekrose erfolgen (Abb. 6.a). Übergänge zwischen den P- und Q-Kompartments beeinflussen die Berechnungen nicht, da das vitale Gesamtvolumen ermittelt wurde.

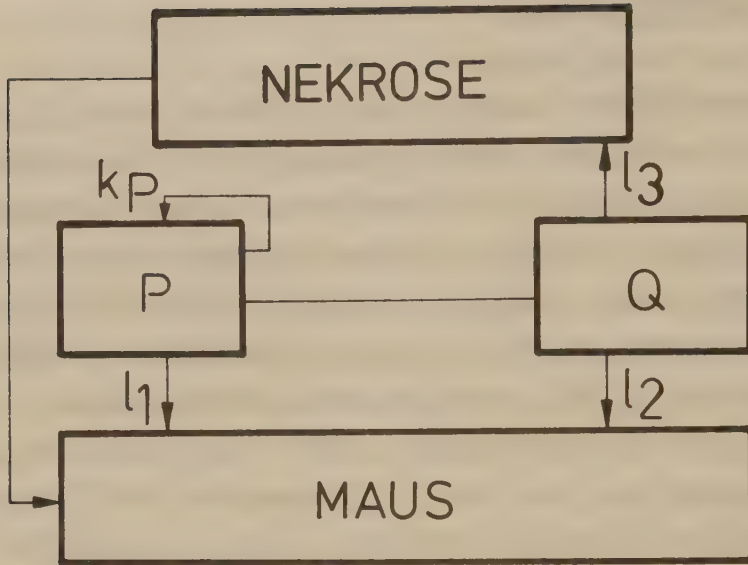


Abb. 6.a: Idealisierte Einteilung des Tumors in vitale proliferierende (P) bzw. ruhende (Q) Zellen und abgestorbenes nekrotisches Tumorgewebe, das sich überwiegend in den distalen Extremitätenabschnitten befindet. Die Übergänge l_1 bis l_3 stellen Volumenverluste des vitalen Tumolvolumens dar. Die Zellproliferationsrate k_p kann aus der Zellzykluszeit t_c abgeleitet werden und zeichnet für das Wachstum des vitalen Anteils verantwortlich.

3) Die Volumenverluste l_1 und $(l_2 + l_3)$ des P- bzw. Q-Kompartiments und die Zellzykluszeit t_c sind konstant. Die Zykluszeit läßt sich aus der initialen Verdopplungszeit T_D der gemessenen Wachstumskurve abschätzen (Sie betrug in diesem Versuch 15 ± 2 Stunden).

4) Während eines kleinen Zeitintervalls nach Implantation nimmt

die Wachstumsfraktion GF den Wert 1 an.

- 5) Der mittlere $^{125}\text{J-UdR}$ Einbau / mm^3 proliferierender Zellen ist unabhängig vom Tumervolumen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit des vitalen Tumorgewebes $\dot{V}_{P+Q}$ kann in der oben skizzierten idealisierten Vorstellung durch eine Differentialgleichung 1. Ordnung wiedergegeben werden (Henrichs, 1979).

$$\dot{V}_{P+Q} = k_p \cdot V_P - l_1 \cdot V_P - (l_2 + l_3) V_Q \quad (22)$$

Da das vitale Tumervolumen V_{P+Q} aus proliferierenden (V_P) und ruhendem (V_Q) Tumervolumen zusammengesetzt ist und die Wachstumsfraktion GF den Anteil des proliferierenden Volumens am vitalen Tumervolumen beschreibt (Mendelsohn, 1960), kann Gleichung 22 umgeformt werden zu:

$$\begin{aligned} \frac{\dot{V}_{P+Q}}{V_{P+Q}} &= k_p \cdot GF - l_1 \cdot GF - (l_2 + l_3) (1-GF) \\ &= k_p \cdot GF - l_1 \cdot GF - (l_2 + l_3) + (l_2 + l_3)GF \end{aligned}$$

Dies führt schließlich zu einem linearen Zusammenhang zwischen der Wachstumsfraktion GF und der relativen Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}_{P+Q} / V_{P+Q}$ des vitalen Tumorgewebes:

$$GF = \frac{1}{k_p - l_1 + (l_2 + l_3)} \cdot \frac{\dot{V}_{P+Q}}{V_{P+Q}} + \frac{(l_2 + l_3)}{k_p - l_1 + (l_2 + l_3)} \quad (23)$$

Die Einteilung des vitalen Tumorgewebes in scharf voneinander getrennte ruhende und proliferierende Zellen mit einer einheitlichen Zellzykluszeit stellt eine Vereinfachung der real existierenden Gegebenheiten dar, da zwischen beiden Subpopulationen fließende Übergänge bestehen (Caspersson & Santesson, 1942; Tan-

nock, 1972) und die Zellzykluszeit einer zeitlichen Streuung unterworfen ist (Begg, 1975; Denekamp, 1970; Steel et al., 1966). Diese modellhaften Vorstellungen haben sich jedoch als anwendbar für zellkinetische Analysen erwiesen (Dethlefsen et al., 1977; Mendelsohn, 1965; Roti Roti et al., 1978; Steel, 1968). Da das vitale Gewebe fast ausschließlich aus recht monomorphen Tumorzellen besteht, entfallen mögliche Störfaktoren der Volumenbestimmung wie Einwanderung von Abwehrzellen, Zysten und Hämorrhagien (Inch & McCredie, 1968; Simpson-Herren, 1975) und die Wachstumsbetrachtungen erstrecken sich somit nur auf die vitale Tumorzellpopulation.

Die Zellzykluszeiten tierischer Experimentaltumoren sind innerhalb der experimentellen Fehler weitgehend unbeeinflusst vom Tumorumfang (Kap. 2.2.3.), so daß die Annahme einer konstanten Zellzykluszeit gerechtfertigt erscheint. Die aus der Volumenkurve ermittelte initiale Verdopplungszeit ($T_D = 15 \pm 2$ Stunden) unterscheidet sich nur geringfügig von der autoradiographisch gemessenen Zellzykluszeit von 19 Stunden eines 7 Tage alten Tumors (König, 1978). Eine Extrapolation der Volumenkurve (Abb. 6.c) auf den Zeitpunkt der Implantation ergibt ein Volumen zwischen 1 und 3 mm³ verglichen mit einem theoretischen Injektionsvolumen von 0,35 mm³, wenn man eine Zahl von $5 \cdot 10^8$ Zellen pro cm³ Gewebe voraussetzt (Begg, 1975). Die gute Übereinstimmung zwischen dem extrapolierten und injizierten Volumen zeigt, daß die Wachstumsrate des Tumors während des makroskopisch nicht erfaßbaren Zeitintervalls ("silent interval") überwiegend konstant bleibt (Clifton & Yatvin, 1970) und die Wachstumsfraktion sich dem Wert 1 nähert, wenn nicht sogar annimmt, da die ermittelte Zellzykluszeit mit der initialen Verdopplungszeit befriedigend korreliert.

Die Verdopplungszeit während des stillen Intervalls kann nach Injektion abgestufter Zellzahlen ermittelt werden, wenn die Zeitspanne für jedes Inokulum notiert wird, bis zu der die Transplan-

tate eine bestimmte Größe angenommen haben (Steel, 1977). Da die Wirtstiere nur eine gewisse Menge lebender Tumorzellen ertragen können (Schatten, 1962) und das maximal erreichbare Tumolvolumen nicht von der injizierten Zellzahl abhängt (Jenkinson et al., 1975), kann anstatt eines bestimmten Volumens auch die Überlebenszeit als biologischer Endpunkt gewertet werden. Aus Abbildung 4.2.b kann man entnehmen, daß ein Faktor 10 in der Zellzahl die Überlebenszeit jeweils um zwei Tage verkürzt. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von 14,5 Stunden im stillen Intervall, die sich also mit der initialen Verdopplungszeit im makroskopischen Wachstumsbereich deckt.

Um die in Gleichung 23 angegebene Beziehung zwischen der Wachstumsfraktion und der Wachstumsrate in Beziehung mit der eingebauten ^{125}J -UdR Aktivität setzen zu können, ist eine strenge Proportionalität zwischen dem ^{125}J -Einbau und der Anzahl der proliferierenden Zellen erforderlich (Annahme 5). Für Mammacarcinome bis einem Volumen von 5000 mm^3 ebenso wie für Zellkulturen ist nachgewiesen worden, daß eine konstante Menge Joddesoxyuridin pro Gewichtseinheit neu synthetisierter Desoxyribonucleinsäure vorhanden ist (Clifton & Yatvin, 1970; Dethlefsen, 1969, 1971; Mak & Till, 1963). Somit ist der Versuch gerechtfertigt, aus dem ^{125}J -UdR Einbau den Anteil der proliferierenden Zellen zu ermitteln. Die dafür von Hofer & Hughes (1970) aufgestellten Forderungen sind beim System E0 771 / C57 BL/6J erfüllt, da es sich beim Implantationsbett um nicht proliferierende Muskulatur handelt und auch der Ganzkörpereinbau durch die Anwesenheit des Implantats nicht gestört wird (Kap. 4.4.).

Der gemessene ^{125}J -UdR Einbau pro mm^3 vitales Tumorgewebe (E/V_{P+Q}) zeigt eine lineare Korrelation mit der relativen Wachstumsgeschwindigkeit des vitalen Gewebes (Abb. 6.b). Dabei gilt bis zu einer Wachstumsrate von $0,005 \text{ h}^{-1}$ die Beziehung ($r^2 = 0,979$):

$$\frac{E}{V_{P+Q}} = 76,88 \cdot 10^{-4} \frac{\dot{V}_{P+Q}}{V_{P+Q}} + 1,42 \cdot 10^{-4} / \mu\text{Ci} \cdot 10^{-4} / \text{mm}^3 \quad (24)$$

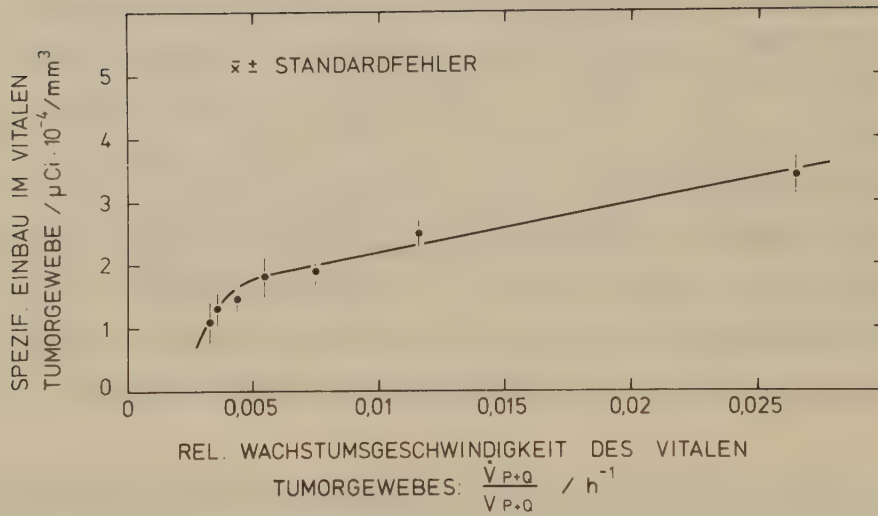


Abb. 6.b: Über einen beträchtlichen Wachstumsbereich besteht eine lineare Beziehung zwischen dem spezifischen ^{125}J -Einbau und der Wachstumsrate des vitalen Gewebes.

Werte eines anderen Versuchs ergaben ähnliche Ergebnisse:

$$\frac{E}{V_{P+Q}} = 82,57 \cdot 10^{-4} \frac{\dot{V}_{P+Q}}{V_{P+Q}} + 1,27 \cdot 10^{-4} / \mu Ci \cdot 10^{-4} / mm^3$$

Die Einengung der Gleichung 24 auf einen begrenzten Wachstumsbereich ergibt sich aus ihrer Umformung:

$$E = 76,88 \cdot 10^{-4} \cdot \dot{V}_{P+Q} + 1,42 \cdot 10^{-4} \cdot V_{P+Q}$$

Da die Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}_{P+Q}$ in dem Bereich, in dem der ^{125}J -Einbau gemessen wurde, konstant ist (es herrschen lineare Wachstumsbedingungen):

$$E = a + 1,42 \cdot 10^{-4} \cdot V_{P+Q} \quad (25)$$

mit

$$a = 76,88 \cdot 10^{-4} \cdot \dot{V}_{P+Q}$$

Diese aus Gleichung 24 entwickelte und geforderte lineare Beziehung zwischen der inkorporierten Menge E und dem vitalen Volumen V_{P+Q} besteht bis zu einem vitalen Volumen von ungefähr 2000 mm³, was einer Wachstumsrate von 0,5 %/h entspricht. Obwohl eine Gerade auch an alle Werte in Abbildung 6.b befriedigend angepaßt werden könnte ($r^2 = 0,933$), ist die Beschränkung auf einen abgegrenzten Bereich der Tumorentwicklung somit dennoch erforderlich.

Aus Gleichung 25 ergibt sich außerdem, daß das vitale Tumorumfassen aus dem gemessenen ¹²⁵J-Einbau E berechnet werden kann. Die gute Übereinstimmung der gemessenen und berechneten Tumorumfassen (Abb. 6.c) zeigt, daß die Fehler, die bei der Ermittlung der Wachstumsrate entstehen, in Gleichung 24 vernachlässigt werden können.

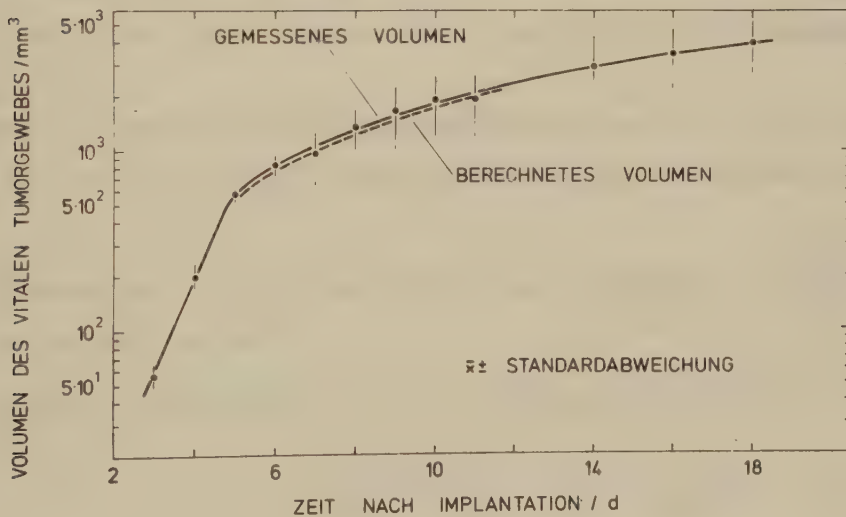


Abb. 6.c: Vergleich der gemessenen und der aus dem ¹²⁵J-Einbau berechneten Tumorumfassen

Für eine Wachstumsfraktion von 1 und der Annahme, daß die gemessene initiale Verdopplungszeit der Zellzykluszeit entspricht, gilt:

$$\frac{\dot{V}_{P+Q}}{V_{P+Q}} = k_P = \frac{\ln 2}{t_c} \quad (26)$$

Für Gleichung 23 bedeutet dies:

$$1 = \frac{1}{k_P - l_1 + (l_2 + l_3)} \cdot k_P + \frac{(l_2 + l_3)}{k_P - l_1 + (l_2 + l_3)}$$

Mit $k_P - l_1 + (l_2 + l_3) \neq 0$ ergibt sich:

$$l_1 = 0,0 \text{ h}^{-1}$$

d.h., Volumenverluste des P-Kompartiment sind nicht vorhanden. Vergleichbare Befunde wurden autoradiographisch beim C3H Mammacarcinom erhoben (Dethlefsen et al., 1977). Diesem Zahlenwert entsprechen die Beobachtungen beim Carcinom E0 771, daß pyknotische Zellen in vitalen Gewebeverbände nicht vorhanden sind, Metastasen makroskopisch nicht vorkommen und daß immunologische Abwehrmechanismen bei diesem experimentellem System nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Der Einbau E des vitalen Tumorumfanges entspricht einem mittleren Einbau e pro mm^3 proliferierender Zellen:

$$\frac{E}{V_{P+Q}} = \frac{e \cdot V_P}{V_{P+Q}} = e \cdot GF \quad (27)$$

Die Substitution von E/V_{P+Q} durch $e \cdot GF$ in Gleichung 24 ergibt:

$$GF = 76,88 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{\dot{V}_{P+Q}}{V_{P+Q}} \cdot \frac{1}{e} + 1,42 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{1}{e}$$

Ein Vergleich mit Gleichung 23 zeigt, daß

$$\frac{1}{k_p - l_1 + (l_2 + l_3)} = 76,88 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{1}{e}$$

und

$$\frac{(l_2 + l_3)}{k_p - l_1 + (l_2 + l_3)} = 1,42 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{1}{e}$$

ist, so daß die Verlustrate $(l_2 + l_3)$ der ruhenden Zellpopulation durch Division der beiden Zahlenwerte ermittelt werden kann:

$$(l_2 + l_3) = 0,01845 \text{ h}^{-1}$$

Die Zahlenwerte für k_p , l_1 und $(l_2 + l_3)$ können in Gleichung 23 eingesetzt werden:

$$GF = 15,47 \frac{\dot{V}_{P+Q}}{V_{P+Q}} + 0,285$$

Da die relative Wachstumsgeschwindigkeit aus der gemessenen Tumorkurve (Abb. 6.c) entnommen werden kann, ist es möglich, die Wachstumsfraktion GF der vitalen Zellpopulation während der Tumorentwicklung zu berechnen. Die Volumenverlustrate l^* des vitalen Gewebes ergibt sich aus:

$$l^* = l_1 \cdot GF + (l_2 + l_3) (1 - GF) \quad (28)$$

Die gewonnenen Ergebnisse können aus Abbildung 6.d und Tabelle 6. entnommen werden.

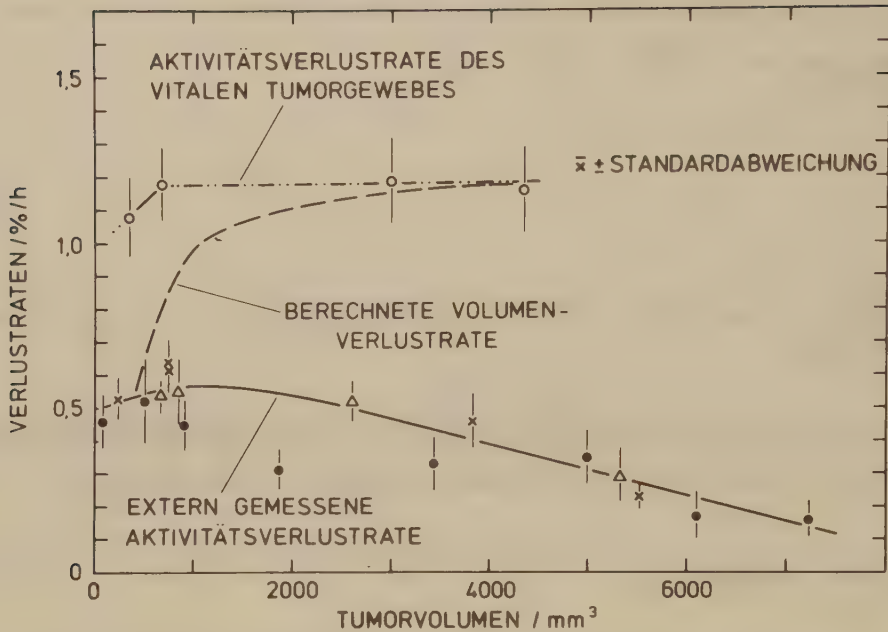


Abb. 6.d: Vergleich zwischen den berechneten Volumenverlustraten und gemessenen Aktivitätsverlustraten des vitalen Tumorgewebes als Funktion des Tumorzvolumens. Die extern gemessene Aktivitätsverlustrate des Gesamttumors ist ebenfalls aufgeführt.

Die berechnete Volumenverlustatenkurve stellt Verluste lebender Tumorzellen im Sinne der Steel'schen Definition (Kap. 2.2.2.) dar. Nach einem schnellen Anstieg innerhalb eines kleinen Größenbereichs erreicht sie ab einem Tumorzvolumen von 1500 mm³ einen nahezu konstanten Wert. In Verbindung mit der als konstant vorausgesetzten intermitotischen Zeit und der sich nur noch geringfügig ändernden "growth fraction" (Tab. 6) bedeutet dies, daß sich das Wachstum des vitalen Anteils einem exponentiellen Verlauf - im halblogarithmischen Maßstab einer Geraden - annähern mußte. Abbildung 6.c zeigt, daß die gemessenen Werte später als 8 Tage nach Implantation nicht übermäßig vom exponentiellen Wachstum abweichen.

Somit deckt sich der Verlauf der berechneten zellkinetischen Parameter mit der Tumorentwicklung.

Die Verluste der Zellpopulation setzt sich nach Gleichung 28 aus den Verlustaten der P- und Q-Kompartments und ihren Anteilen am vitalen Volumen zusammen. Volumenverluste und Aktivitätsverluste können somit nur gleichgesetzt werden, wenn die Anteile der einzelnen Kompartments an der Aktivität des vitalen Gewebes ihren Volumenanteilen zu jedem Zeitpunkt nach Markierung mit Joddesoxyuridin entsprechen. Für das vitale Volumen scheint dies weitgehend zu gelten, da die markierte, proliferierende Zelle in schlechter mit Sauerstoff versorgte Gebiete abgedrängt wird, während gleichzeitig die Wachstumsfraktion absinkt (Tab. 6., Kap. 2.2.4., 5.5.). Autoradiographische Befunde (Bosiljanoff et al., 1977; Hirst & Denekamp, 1979), wonach ab ungefähr 50 Stunden nach ^3H -TdR Injektion eine weitgehend homogene Markierung der vitalen Tumorzellen besteht, und die gute Übereinstimmung zwischen gemessenen Aktivitätsverlustaten und berechneten Volumenverlustaten stützen diese Vermutung.

Die anfängliche scheinbare Diskrepanz zwischen gemessenen und berechneten Verlusten für Volumina unter 1000 mm^3 (Abb. 6.d) läßt sich leicht erklären. Die Meßwerte für die Aktivitätsverlustate des vitalen Anteils sind über dem jeweiligen Volumen zur Zeit der ^{125}J -UdR Injektion aufgetragen. Da diese kleinen Tumoren während der ersten 50 Stunden nach Applikation, in denen wegen der Ausscheidung des säurelöslichen Materials noch nicht gemessen werden kann, eine hohe Wachstumsrate besitzen und deshalb schnell an Volumen gewinnen, gelten die Meßwerte prinzipiell erst für Volumina, die 50 Stunden nach Injektion erreicht werden, und entsprechen somit den berechneten Volumenverlustaten des vitalen Tumorgewebes. Um Vergleiche mit anderen Autoren zu ermöglichen, wurden die Meßwerte jedoch trotzdem für das Injektionsvolumen aufgezeichnet. Dies zeigt jedoch auch, daß schnelle Veränderungen

der Verlustrate in einem begrenzten Volumenbereich mit der ^{125}J -UdR Methode nicht erfaßt werden können, da im Gegensatz zur autoradiographischen und volumetrischen Verlustmessung der Aktivitätsverlust über einen längeren Zeitraum registriert werden muß, in dem die Tumorentwicklung fortschreitet. Die so gewonnenen Aktivitätsverlustraten stellen deshalb quasi einen Mittelwert der Verlustrate in dem während der Aktivitätsmessung erfaßten Volumenbereich dar.

Da unabhängig vom Tumolvolumen 200 Stunden nach Injektion die pyknotischen Zellen 76% der Tumoraktivität enthalten, wurden die extern gemessenen Aktivitätsverlustraten des Tumors über den nekrotischen Anteil korrigiert (Tab. 6., Spalte 4). Die so erhaltenen Verlustraten der vitalen Anteile stimmen gut mit den gemessenen Werten anderer Experimente (Tab. 6., Spalte 5) überein. Da die Aktivitätsverteilung im Tumor nur bis zu einem Volumen von 4300 mm^3 untersucht wurde, sind die letzten drei korrigierten Werte in Klammern gesetzt. Die gemessenen und berechneten Verluste im vitalen Tumorgewebe lassen es auch unwahrscheinlich erscheinen, daß die Verluste bei größeren Tumoren wieder absinken, besonders da der Nekroseanteil weiterhin leicht ansteigt (Abb. 4.1.b).

Obwohl die externe Meßtechnik also keine quantitativen Werte des Zelltods im Tumor liefert, können durch Vergleiche mit Kontrollgruppen Aussagen über die Effektivität einer Tumorthherapie gemacht werden, da hierbei nur die therapieinduzierte Erhöhung des Aktivitätsverlusts mit steigender Strahlen- oder Arzneimitteldosis von Bedeutung ist (Begg, 1975; Bosiljanoff et al., 1977; Feinendegen, 1971, 1976; Gartzen, 1978; Gewehr, 1977; Heitmann, 1977; Konietzny, 1977; Pittner et al., 1973; Porschen & Feinendegen, 1973; Porschen et al., 1970, 1977, 1978, 1979; Weber, 1976). Wegen der in Kapitel 5 erwähnten Störfaktoren wird die mögliche Therapieverbesserung eher noch unterschätzt.

Tumor- volumen*	Volumen des vitalen Gewebes	berechnete tumorfraction des vitalen Gewebes ± SD**	Extern ge- messene Aktivitätsver- lustrate ± SD	korrigiert über nektrotische Aktivität ± SD	gemessene Ak- tivitätsverlust- rate des vitalen Gewebes ± SD	berechnete Vo- lumenverlustrate des vitalen Gewebes ± SD
mm ³	mm ³	%	%/h	%/h	%/h	%/h
300	300	—	—	—	1,08 ± 0,12	—
570	570	70 ± 7	0,52 ± 0,13	1,22 ± 0,31	—	0,56 ± 0,12
640	640	—	—	—	1,18 ± 0,11***	—
815	815	54 ± 5	—	—	—	0,86 ± 0,09
950	943	47 ± 5	0,45 ± 0,07	1,16 ± 0,17	—	0,99 ± 0,08
1470	1345	43 ± 4	—	—	—	1,06 ± 0,08
2005	1646	40 ± 4	0,31 ± 0,06	1,10 ± 0,18	—	1,11 ± 0,08
2800	1915	38 ± 4	—	—	—	1,14 ± 0,07
2949	1651	—	—	—	1,20 ± 0,13	—
3327	1893	37 ± 4	0,34 ± 0,08	1,05 ± 0,25	—	1,16 ± 0,07
4100	2296	36 ± 3	—	—	—	1,18 ± 0,07
4300	2232	—	—	—	1,16 ± 0,13***	—
4900	2701	—	0,35 ± 0,08	(1,07 ± 0,24)	—	—
6200	3310	—	0,17 ± 0,06	(0,89 ± 0,37)	—	—
6560	3444	—	0,16 ± 0,05	(0,88 ± 0,27)	—	—

* Mittelwerte des Tumolvolumens aller Gruppen bei dem Versuch, bei dem der Aktivitätsverlust extern gemessen wurde

** SD = Standardabweichung

*** Diese Werte stammen aus Vorversuchen

Tab. 6: Gemessene und berechnete zellkinetische Parameter des Carcinoms EO 771. Erläuterungen siehe Text.

Die Wiederverwertung von Joddesoxyuridin dürfte dabei nur geringfügig über derjenigen in ungestörten Tumoren liegen. Erstens werden von der Bestrahlung zum großen Teil Zellen betroffen, die wegen ihrer perivaskulären Lage gut aus dem Tumor eliminiert werden können, zweitens wird dadurch auch die Anzahl der proliferierenden Zellen, die J-UdR reutilisieren könnten, vermindert und drittens wird bei Zelltod bedeutend mehr Thymidin als Joddesoxyuridin freigesetzt (Kap. 5.4.). Dadurch wird der J-UdR Einbau weitgehend unterdrückt (Dethlefsen, 1971; Hughes et al., 1964; Prusoff et al., 1960).

Bei Markierung größerer Tumoren ist die in-situ gemessene Aktivitätsverlustrate (Abb. 6.d) größer als das Produkt Nekroseanteil $\times$ Eliminationsrate nekrotischer Zellen. Daraus kann gefolgert werden, daß Aktivitätsverluste nicht nur ausschließlich nach einem Übergang in das nekrotische Kompartiment auftreten, sondern daß ruhende Zellen auch via ℓ_2 (Abb. 6.a) direkt in die Maus übertreten können. Dafür spricht auch der Unterschied zwischen der berechneten Verlustrate ($\ell_2 + \ell_3$) des Q-Kompartments und der gemessenen Rate des Einstroms markierter Zellen in die Nekrose (Kap. 4.8.), wenn man voraussetzt, daß nur markierte Q-Zellen in die Nekrose übertreten.

Die Wachstumsfraktion der meisten untersuchten Experimentaltumoren nimmt während der Tumorentwicklung ab (Tab. 2.2.3.). Entsprechende Werte für das Adenocarcinom EO 771 finden sich in Tabelle 6. Nach einer dreißigstündigen ^3H -TdR Dauermarkierung eines 800 mm^3 großen Tumors wurde ein Markierungsindex von ungefähr 90% gefunden, woraus eine Wachstumsfraktion von 90 Prozent für dieses Adenocarcinom abgeleitet wurde (König, 1978). Da die Kurven des Markierungsindex nach Dauermarkierung einer wachsenden Zellpopulation jedoch nicht in ein Plateau auslaufen, das der "growth fraction" entspricht (Steel, 1977),

und Modelle für exponentielles Wachstum in diesem Volumenbereich nur schwerlich anzuwenden sind, können Fehlerquellen bei diesem Wert nicht ausgeschlossen werden. Beim Sarkom 180 stimmen die autoradiographisch gemessenen und die aus dem J-UdR Einbau des Gesamttumors berechneten Werte für die Wachstumsfraktion des Tumors überein (Henrichs, 1979).

Zellverluste können durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden (Kap. 2.2.2.). Metastasenbildung, Abschlüpfung aus oberflächlich gelegenen Carcinomen und Immunvorgänge scheiden als mögliche Gründe beim Mammaadenocarcinom E0 771 wegen der in den vorangehenden Kapiteln aufgeführten Beobachtungen und wegen des Implantationsortes weitgehend aus. Bei diesem Tumor spricht der starke Nekroseanteil, dessen Kurve einen ähnlichen Verlauf wie diejenige des berechneten Volumenverlustes aufweist, für eine inadäquate Blutversorgung als hauptsächliche Ursache des Zelltods. Dies steht in Einklang mit der Halbwertszeit der ^{125}J -Anflutung und der ^{125}J -Aufnahme pro Volumeneinheit Tumorgewebe eine Stunde nach Injektion als relatives Maß der Blutversorgung (Sapirstein, 1958), die während des Tumorstadiums zu- bzw. abnehmen (Kap. 4.5.). Mangelnde Sauerstoffversorgung der Tumorzellen führt zu verstärkter Nekrosebildung (Schatten, 1962; Tannock, 1968).

7. Zusammenfassung

Die Methode, Zellverluste in-situ aus dem Abfall der Radioaktivität nach einer einzelnen intraperitonealen Injektion des Thymidinanalogs ^{125}J oddesoxyuridin zu ermitteln, wurde während verschiedener Phasen der Tumorentwicklung des soliden Mammaadenocarcinoms E0 771 auf männlichen C57 B1/6J Mäusen auf ihre Anwendbarkeit getestet. Invasive Untersuchungen über die Aktivitätsverteilung in vitalen und nekrotischen Tumorbereichen wurden nach Injektion des Farbstoffes Lichtgrün SF durchgeführt.

Die in der Haut über den Tumoren vorhandene Aktivität, die nicht DNA-gebundene Radioaktivität, die Toxizität des Tracers und die Einwanderung markierter Wirtszellen sind bei diesem syngenem Tumor-Wirt-System ohne wesentlichen Einfluß auf die extern ermittelte Aktivitätsverlustrate des Tumors.

Injektionen abgetöteter markierter Tumorzellen in verschieden große Neoplasmen zeigten, daß die Wiederverwertung von Joddesoxyuridin unter 10 Prozent liegt und unabhängig vom Tumolvolumen ist. Die Reutilisation von ^3H -Thymidin ist demgegenüber wesentlich ausgeprägter.

Die Abnahme der in-vivo gemessenen Aktivitätsverlustrate in Abhängigkeit vom Injektionsvolumen konnte durch einen Übergang markierter Zellen aus vitalen in nekrotische Tumorbezirke, deren Anteil am Gesamtvolumen während des Tumorwachstums zunahm, und die verlangsamte Elimination markierter Zellabbauprodukte erklärt werden.

Die Messung der inkorporierten Aktivität pro Gewichtseinheit und der relativen Wachstumsgeschwindigkeit des vitalen Tumoranteils ermöglichte es, die Wachstumsfraktion GF und Volumenverluste des

vitalen Tumorgewebes als Funktion des Tumorumens zu berechnen.

Aus der vorliegenden Untersuchung lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die externe Messung des Aktivitätsverlustes erfaßt eher den Abtransport markierter Zellen und ihrer Abbauprodukte als den Zelltod. Die Gesamtaktivität des Tumors entspricht zu jedem Zeitpunkt nach Injektion der Summe der Aktivitäten in proliferierenden, ruhenden und nekrotischen Kompartments.
2. In soliden Tumoren bestehen Bereiche mit unterschiedlicher Abtransportkapazität.
3. Die ^{125}J -UdR Methode ermittelt nicht eine bestimmte Verlustrate als Funktion eines bestimmten Volumens, sondern einen Mittelwert.
4. Aktivitätsverluste vitaler Tumorzellen entsprechen weitgehend dem Zellverlust.

8. Literaturverzeichnis

Abrams, H.L.

Altered Drug Response of Tumour Vessels in Man.

Nature, 201, 167-170, (1964)

Algire, G.H., Chalkley, H.W.

Vascular Reactions of Normal and Malignant Tissues in Vivo.

I. Vascular Reactions of Mice to Wounds and to Normal and Neoplastic Transplants.

J. Nat. Cancer Inst., 6, 73-85, (1945)

Bagshawe, K.D.

Medical Oncology

Medical Aspects of Malignant Disease.

Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, (1975)

Balis, M.E.

The Metabolism of Purines by Tumors.

Acta Unio internat. contra cancrum, 16, 1037-1043, (1960)

Balis, M.E., Salser, J.S.

The Interconversion of Purines by Tumors and the Action of Anti-Purines.

Acta Unio internat. contra cancrum, 20, 115-117, (1964)

Baugnet-Mahieu, L., Goutier, R.

Mechanisms Responsible for the Low Incorporation into DNA of the Thymidine Analogue, 5-Iodo-2'-Deoxyuridine.

Biochem. Pharmacol., 17, 1017-1023, (1968)

Begg, A.C.

Kinetic and Histological Changes of a Serially Transplanted Mouse Tumour.

Cell Tissue Kinet., 4, 401-411, (1971)

Begg, A.C.

Studies of Cell Removal from Irradiated and Unirradiated Murine Tumours Using ¹²⁵I-Iododeoxyuridine and Tritiated Thymidine.

Ph. D. thesis, University of London, (1975)

Begg, A.C.

Cell loss from Several Types of Solid Murine Tumour:

Comparison of ¹²⁵I-Iododeoxyuridine and Tritiated Thymidine Methods.

Cell Tissue Kinet., 10, 409-427, (1977)

Bessis, M.

Studies on Cell Agony and Death: An Attempt at Classification.

Ciba Foundation Symposium on Cellular Injury,

Editors: de Renck and Knight.

Churchill, London, 287-316, (1964)

Bierman, H.R., Kelly, K.H., Singer, G.
Studies on the Blood Supply of Tumors in Man
IV. The Increased Oxygen Content of Venous Blood
Draining Neoplasms.
J. Nat. Cancer Inst., 12 (4), 701-707, (1952)

Bloomer, W.D., Adelstein, S.J.
Antineoplastic Effect of Iodine-125 Labeled 5-Iodo-
deoxyuridine ($^{125}\text{IUdR}$).
Internat. Conference on Molecular- and Microdistribution
of Radioisotopes and Biological Consequences
Jülich, 2.-4. October, (1975)

Blum, H.F.
Estimation of Growth Rates of Tumors.
J. Nat. Cancer Inst. 4, 21-24, (1943)

Bosco, R.B.
Einfluß einer Immunisierung mit stark bestrahlten Tumor-
zellen auf die Zellverlustrate und das Tumorstadium:
In-vivo-Untersuchungen am soliden Sarkom 180 mit
125-Jod-Desoxyuridin.
Ingenieurarbeit, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1973)

Bosiljanoff, P., Porschen, W., Piepenbring, W.,
Mühlensiepen, H., Feinendegen, L.E.
In-vivo-Untersuchungen über die relative Strahlenempfind-
lichkeit hypoxischer Tumorzellen.
Strahlentherapie, 153, 178-189, (1977)

Brammer, I.
Untersuchungen zur Proliferationskinetik des Walker-Karzinom-256
in Abhängigkeit von Topographie und Alter.
Diplomarbeit, Institut für Biophysik, Universität Hamburg, (1976)

Burton, A.C.
Rate of Growth of Solid Tumours as a Problem of Diffusion.
Growth, 30, 157-176, (1966)

Caspersson, T., Santesson, L.
Studies on Protein Metabolism in the Cells of Epithelial Tumors.
Acta Radiol. Supplement 46
Kungl. Boktryckeriet, P.A. Norstedt & Söner, Stockholm, (1942)

Cataland, S., Cohen, C., Sapirstein, L.A.
Relationship between Size and Perfusion Rate of Transplanted
Tumors.
J. Nat. Cancer Inst., 29, 389-394, (1962)

Cavallo, T., Sade, R., Folkman, J., Cotran, R.S.
Tumor Angiogenesis
Rapid Induction of Endothelial Mitoses Demonstrated by Autoradiography.
J. Cell Biology, 54, 408-420, (1972)

- Chan, P.C., Lisco, E., Lisco, H., Adelstein, S.J.
Cell Survival and Cytogenetic Responses to $^{125}\text{IUdR}$
in Cultured Mammalian Cells.
Internat. Conference on Molecular- and Microdistribution
of Radioisotopes and Biological Consequences
Jülich, 2.-4. October, (1975)
- Clifton, K.H., Yatvin, M.B.
Cell Population Growth and Cell Loss in the MTG-B Mouse
Mammary Carcinoma.
Cancer Res., 30, 658-664, (1970)
- Clifton, K.H., Cooper, J.M.
Reutilization of Thymidine and Iododeoxyuridine by Mouse
Mammary Carcinoma Strain MTG-B.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 142, 1145-1151, (1973)
- Commerford, S.L.
Biological Stability of 5-Iodo-2'-Deoxyuridine Labelled with
Iodine-125 after its Incorporation into the Deoxyribonucleic
Acid of the Mouse.
Nature, 206, 949-950, (1965)
- Cooper, E.H.
The Biology of Cell Death in Tumors.
Cell Tissue Kinet., 6, 87-95, (1973)
- Coutelle, C.
Über Nervenausbreitung in experimentellen Mäusekarzinomen.
Archiv f. Geschwulstforschung, 9, 225-273, (1956)
- Day, E.D.
Vascular Relationships of Tumor and Host.
Progress in Experimental Tumor Research, 4, 57-97, (1964)
Editor: F. Homburger, S. Karger, Basel - New York
- Denekamp, J.
The Cellular Proliferation Kinetics of Animal Tumors.
Cancer Res., 30, 393-400, (1970)
- Denekamp, J.
The Relationship between the 'Cell Loss Factor' and the
Immediate Response to Radiation in Animal Tumours.
Europ. J. Cancer, 8, 335-340, (1972)
- Dethlefsen, L.A.
Incorporation of ^{125}I -labeled 5-Iodo-2'-Deoxyuridine into
the DNA of Mouse Mammary Tumors.
Normal and Malignant Cell Growth.
Editors: R.J.M. Fry, M.L. Griem, W.H. Kristen, Springer, New York, (1969)

- Dethlefsen, L.A.
Reutilization of ^{131}I -5-Iodo-2'-Deoxyuridine as Compared to ^3H -thymidine in Mouse Duodenum and Mammary Tumor.
J. Nat. Cancer Inst., 44, 827-840, (1970)
- Dethlefsen, L.A.
An Evaluation of Radioiodine-labeled 5-Iodo-2'-Deoxyuridine as a Tracer for Measuring Cell Loss from Solid Tumors.
Cell Tissue Kinet. 4, 123-138, (1971)
- Dethlefsen, L.A.
 ^3H -5-Iodo-2'-Deoxyuridine Toxicity
Problems in Cell Proliferation Studies.
Cell Tissue Kinet., 7, 213-222, (1974)
- Dethlefsen, L.A., Sorenson, J., Snively, J.
Cell Loss from three Established Lines of the C3H-Mouse Mammary Tumor: A Comparison of the ^{125}I -UdR and the ^3H -TdR-Autoradiographic Methods.
Cell Tissue Kinet., 10, 447-459, (1977)
- Dunham, L.J., Stewart, H.L.
A Survey of Transplantable and Transmissible Animal Tumors.
J. Nat. Cancer Inst., 13, 1299-1377, (1953)
- Eddy, H.A.
Vascular Dynamics in the Irradiated Cervical Squamous Cell Carcinoma of the Hamster.
Radiation Res., 67 (3), 547, (1976)
- Engerman, R.L., Pfaffenbach, D., Davis, M.D.
Cell Turnover of Capillaries.
Lab. Investig., 17 (6), 738-743, (1967)
- Erbe, W., Linden, W.A., Reddy, S.B., Zywiets, F., Baisch, H.
Studies on the Population Kinetics of the Walker Carcinoma by Autoradiography and Pulse Cytophotometry.
Cell Tissue Kinet. 10, 269-277, (1977)
- Ertl, H.H.
Dosimetrie und biologische Wirkung des Auger-Effekts
Ganzkörpermessung mit intranuklearem ^{125}Jod -Desoxyuridin.
Dissertation, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1970)
- Ertl, H.H., Feinendegen, L.E., Heiniger, H.J.
Iodine-125, a Tracer in Cell Biology: Physical Properties and Biological Aspects.
Phys. Med. Biol., 15, 447-456, (1970)
- Feinendegen, L.E., Bond, V.P., Hughes, W.L.
Physiological Thymidine Reutilization in Rat Bone Marrow.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122, 448-455, (1966 a)

Feinendegen, L.E., Bond, V.P., Hughes, W.L.
125-I-DU (5-Iodo-2'-Deoxyuridine) in Autoradiographic Studies
of Cell Proliferation.
Exp. Cell Res., 43, 107-119, (1966 b)

Feinendegen, L.E.
Tritium-Labeled Molecules in Biology and Medicine.
Monography of the U.S. Atomic Energy Commission and American
Institute of Biological Sciences.
Academic Press, New York, (1967)

Feinendegen, L.E., Ertl, H.H., Bond, V.P.
Biological Toxicity Associated with the Auger Effect.
Biophysical Aspects of Radiation Quality.
IAEA-SM-145/22, 419-430, Vienna, (1971)

Feinendegen, L.E.
Autoradiographische und biochemische Untersuchungen der Zell-
proliferation in vivo.
Präoperative Tumorbestrahlung, Vorträge vom Deutschen Röntgen-
kongreß 1970, Herausgeber: O. Hug,
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, (1971)

Feinendegen, L.E.
Zelluläre Aspekte der Strahlensensibilisierung.
Strahlentherapie 143, 257, (1972)

Feinendegen, L.E., Heiniger, H.J., Friedrich, G., Cronkite, E.P.
Differences in Reutilization of Thymidine in Hemopoietic and
Lymphopoietic Tissues of the Normal Mouse.
Cell Tissue Kinet., 6, 573-585, (1973)

Feinendegen, L.E.
Biological Damage from the Auger Effect, Possible Benefits.
Radiation Environ. Biophys., 12, 85, (1975)

Feinendegen, L.E.
Biokybernetik und onkologische Cytokinetik.
XIV. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V.,
Berlin, (1976)

Feinendegen, L.E.
Prospects and Problems on the Application of Isotope to Pure
and Applied Cytology.
Radiotracer Techniques and Applications
Editors: E.A. Evans, M. Muramatsu,
Marcel Dekker Inc., New York, 769-821, (1977)

Fike, J.R., Gillette, E.L., Clow, D.J.
Response of Endothelial Cells to Neutrons and X Radiation.
Radiation Res., 67 (3), 539, (1976)

Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., Williams, G.
Isolation of a Tumor Factor Responsible for Angiogenesis.
J. Exp. Med., 133, 275-288, (1971)

Folkman, J.
Tumor Angiogenesis.
Advances in Cancer Research, 19, 331-358, London
Academic Press, (1974)

Forman, J., Ketchel, M.M., Hofer, K.G.
Tumor Immunity in Vivo
Use of the $^{125}\text{IUdR}$ Prelabeling Technique to Monitor
Cell Death in Immune Animals.
Transplantation, 14 (2), 166-174, (1972)

Fortner, G.W., Kuperman, O., Lucas, Z.J.
Immune Response to a Syngeneic Mammary Adenocarcinoma
I. Comparison of Kinetics of Tumor Cell Growth and
Cytotoxic Responses in Syngeneic and Allogeneic Rats.
J. Immunol., 115, 1269-1276, (1975)

Franko, A.J., Kallman, R.F.
 $^{125}\text{IUdR}$ Loss as a Measure of Tumor Cell Loss: Influence of
Reutilization and Influx of Labelled Host Cells.
9th L.H. Gray Memorial Conference, Quantitation of Tumour
Response: A Critical Appraisal
Cambridge, September 11-14, (1979)

Freundlieb, C.
In vivo Verhalten des Thymidinanalogs $^{125}\text{-IUdR}$ appliziert
als Bestandteil hydrolysierter bzw. hochpolymerer DNS.
Untersuchung mit Hilfe externer Gammamessung.
Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Düsseldorf, (1973)

Friedrich, G.
DNA-Verwertung in Geweben der Maus
Ein Beitrag zur Quantifizierung des Katabolismus exogener $^3\text{H-TdR}$ -
und $^{125}\text{J-UdR}$ -doppelmarkierter DNA in Säugetierzellen.
Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der
Universität Düsseldorf, (1974)

Frindel, E., Malaise, E.P., Alpen, E., Tubiana, M.
Kinetics of Cell Proliferation of an Experimental Tumor.
Cancer Res., 27 (1), 1122-1131, (1967)

Gartzen, J.
Biologische Parameter eines kollimierten Zyklotron-Neutronenstrahls.
Interner Bericht, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1978)

Gelzer, J., Loustalot, P.
Biological and Chemotherapeutic Studies on Primary Mammary Tumors
in C3H and C3H0 Mice.
Int. J. Cancer, 2, 179-187, (1967)

Gerecke, D., Schultze, B., Maurer, W.
Kinetics of Neutrophilic Granulocytes in the Blood of Rats.
Cell Tissue Kinet., 6, 369-378, (1973)

Gewehr, K.
Strahlensensibilisierung hypoxischer Tumorzellen.
In vivo Messungen der relativen Wirksamkeit elektronenaffiner
Verbindungen durch Zellmarkierung mit ¹²⁵Jod- und ¹³¹Jod-
Desoxyuridin
Dissertation, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1977)

Giesen, L.
Untersuchungen über das Verhalten transfundierter ¹²⁵I-UdR
(¹²⁵Jod-Desoxyuridin) markierter Knochenmarkszellen der Maus.
Dissertation, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1970)

Goldacre, R.J., Sylvén, B.
A Rapid Method for Studying Tumour Blood Supply Using Systemic
Dyes.
Nature, 184, 63-64, (1959)

Goldacre, R.J., Sylvén, B.
On the Access of Blood-Borne Dyes to Various Tumour Regions.
Br. J. Cancer, 16, 306-322, (1962)

Goldmann, E.
The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals
with Special Reference to the Vascular System.
Proc. R. Soc. Med., 1, 1-13, (1907)

Goldmann, E.
Studienzur Biologie der bösartigen Neubildungen.
Beiträge zur Klin. Chirurgie, 72 (1), 1-90, (1911)

Gosalvez, M., Thurman, R.G., Chance, B., Reinhold, H.
Regional Variation in the Oxygenation of Mouse Mammary Tumours
in Vivo Demonstrated by Fluorescence of Pyridine Nucleotide.
Brit. J. Radiol., 45, 510-514, (1972)

Graff, R.J., Snell, G.D.
Histocompatibility Genes of Mice
IX. The Distribution of the Alleles of the Non-H-2
Histocompatibility Loci.
Transplantation, 8 (6), 861-876, (1969 a)

Graff, R.J., Snell, G.D.
Histocompatibility Typing of Inbred Mice for Known Non-H-2
Alleles.
Transplantation Proceedings, 1 (1), 362-364, (1969 b)

Graff, R.J., Polinsky, S.L., Snell, G.D.
Histocompatibility Genes of Mice
X. Additional Non-H-2-Typing.
Transplantation, 11 (1), 56-62, (1971)

Green, E.L. (Editor)
Biology of the Laboratory Mouse.
2nd ed. Mc Graw Hill, New York, 1966

Green, E.L. (Editor)
Handbook on Genetically Standardized JAX Mice.
Second edition, third printing
Bar Harbor Times Publishing Company, Bar Harbor, (1975)

Gullino, P.M., Grantham, F.H.
Studies on the Exchange of Fluids between Host and Tumor
II. The Blood Flow of Hepatomas and Other Tumors in Rats
and Mice.
J. Nat. Cancer Inst., 27, 1465-1492, (1961)

Gullino, P.M., Clark, S.H., Grantham, F.H.
The Interstitial Fluid of Solid Tumors.
Cancer Res., 24, 780-797, (1964)

Gullino, P.M., Grantham, F.H.
The Vascular Space of Growing Tumors.
Cancer Res., 24, 1727-1732, (1964)

Gump, F.E., White, R.L.
Determination of Regional Tumor Blood Flow by Krypton-85.
Cancer, 21, 871-875, (1968)

Hall, E.J.
Radiobiology for the Radiologist.
Harper & Row, Publishers, Inc., 2350 Virginia Avenue
Hagerstown, Maryland 21740, (1973)

Heiniger, H.J., Feinendegen, L.E., Friedrich, G., Ertl, H.H.
Regional Reutilization of Thymidine in the Normal Mouse.
KFA-JÜL-Report 679-ME, (1970)

Heitmann, H.-J.
Bestimmung der Zellverlustrate beim Adenocarcinom EO 771 nach
Gamma-Bestrahlung.
Ingenieurarbeit, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1977)

Henrichs, K.
Nicht-invasive Untersuchungen zur Wachstumskinetik eines soliden
Experimentaltumors.
Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der
Universität Düsseldorf, (1979)

Hermens, A.F., Barendsen, G.W.

Changes of Cell Proliferation Characteristics in a Rat Rhabdomyosarcoma before and after X-Irradiation.
Europ. J. Cancer, 5, 173-189, (1969)

Hirst, D.G., Denekamp, J.

Tumour Cell Proliferation in Relation to the Vasculature.
Cell Tissue Kinet., 12, 31-42, (1979)

Hofer, K.G., Prenskey, W., Hughes, W.L.

Death and Metastatic Distribution of Tumor Cells in Mice Monitored with ¹²⁵I-Iododeoxyuridine.
J. Nat. Cancer Inst., 43, 763-773, (1969)

Hofer, K.G., Hughes, W.L.

Incorporation of Iododeoxyuridine - ¹²⁵I into the DNA of L 1210 Leukemia Cells during Tumor Development.
Cancer Res., 30, 236-243, (1970)

Hofer, K.G., Di Benedetto, J., Hughes, W.L.

Natural and Asparaginase Induced Death of L5178 Y Leukemia Cells in Vivo.
Z. Krebsforschung, 75, 34-44, (1970)

Hofer, K.G., Hughes, W.L.

Radiotoxicity of Intranuclear Tritium, ¹²⁵Iodine and ¹³¹Iodine.
Radiation Res., 47, 94-109, (1971)

Hofer, K.G., Warters, R.L., Rolfes, T.H., Hofer, M.

Viability of Tumor Cells in Mechanically and Enzymatically Prepared Tissue Suspensions.
Europ. J. Cancer, 10, 49-56, (1974)

Hughes, W.L., Commerford, S.L., Gitlin, D., Krueger, R.C.

Schultze, B., Shah, V., Reilly, P.

Deoxyribonucleic Acid Metabolism in Vivo:

I. Cell Proliferation and Death as Measured by Incorporation and Elimination of Iododeoxyuridine.
Fed. Proc., 23, 640-648, (1964)

Ide, A.G., Baker, N.H., Warren, S.L.

Vascularization of the Brown-Pearce Rabbit Epithelioma Transplant as Seen in the Transparent Ear Chamber.
Amer. J. Roentgenol. Radium Ther., 42 (6), 891-899, (1939)

Inch, W.R., McCredie, J.A.

Factors Influencing Radiosensitivity of Animal Tumours.
Canad. Med. Ass. J., 99, 337-342, (1968)

Jarret, A.A.

Statistical Methods Used in the Measurement of Radioactivity with some Useful Graphs and Nomographs.
AECU 262, United States Energy Commission, Oak Ridge, National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, (1946)

Jax Notes 424

The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, (1975)

Jax Notes 426

The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, (1976)

Jenkinson, I.S., Shuter, B.J., Wright, P.N.M.

Cell Kinetics Methods for Clinical Use: Assessment of Autoradiography and ^{125}I -Iodo-Deoxyuridine with Mouse Ehrlich Tumour.

Cell Tissue Kinet., 8, 307-320, (1975)

Johanson, K.J.

Effects of ^{60}Co Gamma Radiation on the Distribution, Catabolism and Incorporation of ^{125}I -5-Iodo-2'-Deoxyuridine into Intestinal and Splenic Deoxyribonucleic Acid in Mice.

Acta Radiol. Ther. Phy. Biol., 11, 556-565, (1972)

Johnson, H.A., Bond, V.P.

A Method of Labeling Tissues with Tritiated Thymidine in Vitro and its Use in Comparing Rates of Cell Proliferation in Duct Epithelium, Fibroadenoma, and Carcinoma of Human Breast.

Cancer, 14, 639-643, (1961)

Kidder, G.W., Dewey, V.C., Parks, R.E., Woodside, G.L.

Purine Metabolism in Tetrahymena and its Relation to Malignant Cells in Mice.

Science, 109, 511-514, (1949)

Klein, G.

Comparative Studies of Mouse Tumors with Respect to their Capacity for Growth as "Ascites Tumors" and their Average Nucleic Acid Content per Cell.

Exp. Cell Research, 2, 518-573, (1951)

Kligerman, M.M., Heidenreich, W.F., Greene, S.

Distribution of Tritiated Thymidine about a Capillary Sinusoid in a Transplanted Mouse Tumour.

Nature, 196, 282-283, (1962)

König, K.

Cell Kinetic Investigation of an Adenocarcinoma of the Mouse.

XIVth Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology, Jülich, Oct., 9-13, (1978)

Kolstad, P.

Vascularization, Oxygen Tension, and Radiocurability in Cancer of the Cervix.

Norwegian Monographs on Medical Science, Aas & Wahls Boktrykkeri, Oslo, (1964)

Konietzny, U.

Bestimmung der Zellverluste beim Adenocarcinom EO 771
nach Bestrahlung mit Co-60-Gamma-Strahlen und schnellen
Neutronen mit und ohne Sensibilisator Misonidazol.
Ingenieurarbeit, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1977)

Kronenberger, P.H., Tisljar-Lentulis, G., Porschen, W.,
Feinendegen, L.E.

DNA-Umsatz in metastasenf freien Organen tumortragender Mäuse;
Einfluß auf Ganzkörpermessungen mit ^{125}J -UdR.
Beitr. Path., 160, 154-174, (1977)

Kruuv, J.A., Inch, W.R., McCredie, J.A.

Blood Flow and Oxygenation of Tumors in Mice
III. Effects of Breathing Amyl Nitrite in Oxygen on
Radiosensitivity of the C3H Tumor.
Cancer, 20, 66-70, (1967)

Kuehne, M.E., Konopka, E.A., Lambert, B.F.

Steroida l Dihydro-1,3-oxazines as Antitumor Agents.
J. Med. Pharm. Chem., 5, 281-296, (1962)

Laird, A.K.

Dynamics of Tumor Growth.
Br. J. Cancer, 18, 490-502, (1964)

Laird, A.K.

Dynamics of Tumour Growth: Comparison of Growth Rates and
Extrapolation of Growth Curve to one Cell.
Br. J. Cancer, 19, 278-291, (1965)

Lamerton, L.F.

General Introduction.
Recent Results in Cancer Research, 17, (1969)
Editor: Rentchnick, Springer, Berlin

Lewis, D.V., Staley, N., Rogers, W., Edlich, R.F.

Studies on the Distribution of Blood Flow in Amelanotic
Melanoma and Reticulum Cell Lymphosarcoma during Growth.
Cancer Res., 28, 1507-1512, (1968)

Mak, S., Till, J.E.

The Effects of X-Rays on the Progress of L-Cells
through the Cell Cycle.
Radiation Res., 20, 600-618, (1963)

Manso, C., Sugiura, K., Wroblewski, F.

Glutathione Reductase and Lactic Dehydrogenase
Activities of Tissues of Rodents with Transplanted Tumors.
Cancer Res., 18, 682-686, (1958)

- Manuelidis, E.E., Dolin, R.
Fine Structural Studies on the Vascularization of
Heterologously Transplanted Tumors.
Ann. N.Y. Acad. Science, 159, 432-445, (1969)
- Maruyama, Y., Feola, J.M.
Active Host Resistance for Transplant Syngeneic
C57 BL Lymphomas.
Oncology, 28, 52-62, (1973)
- Mayneord, W.V.
On a Law of Growth of Jensen's Rat Sarcoma.
Am. J. Cancer, 16, 841-846, (1932)
- McAlister, W.H., Margulis, A.R.
Angiography of Malignant Tumors in Mice Following Irradiation.
Radiology, 81, 664-675, (1963)
- McCredie, J.A., Inch, W.R., Sutherland, R.M.
Differences in Growth and Morphology between the Spontaneous
C3H Mammary Carcinoma in the Mouse and its Syngeneic Transplants.
Cancer, 27, 635-642, (1971)
- Mendelsohn, M.L.
The Growth Fraction: A New Concept Applied to Tumors.
Science, 132, 1496, (1960)
- Mendelsohn, M.L.
The Kinetics of Tumor Cell Proliferation.
Cellular Radiation Biology, M.D. Anderson Hospital
Symposium, Williams & Wilkins, Baltimore, 498-513, (1965)
- Merwin, R.M., Algire, G.H.
The Role of Graft and Host Vessels in the Vascularization
of Grafts of Normal and Neoplastic Tissue.
J. Nat. Cancer Inst., 17 (1), 23-33, (1956)
- Mühlensiepen, H., Porschen, W.
Untersuchungen der zellkinetischen Parameter beim soliden
Experimentaltumor Sarkom 180.
Persönliche Mitteilung, IME, Kernforschungsanlage Jülich (1976)
- Nishioka, B.
Proliferation Kinetics of Sarcoma-180.
GANN, 61, 563-568, (1970)
- Nyström, S.H.M.
Electron Microscopical Structure of the Wall of Small Blood
Vessels in Human Multiform Glioblastoma.
Nature, 184, 65, (1959)

Okumura, Y., Yamada, S., Nishio, S., Morita, T., Matsuzawa, T.
Measurement of the Rate of Cell Loss during Tumor Growth
with Labeled Iododeoxyuridine.
GANN, 64, 499-501, (1973)

Owen, L.N.
A Rapid Method for Studying Tumor Blood Supply Using
Lissamine Green.
Nature, 187, 795-796, (1960)

Pittner, W.
Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit vom Zellzyklus
In Vivo Untersuchungen am transplantierten Sarkom 180
mit ^{125}I -Jod-Deoxyuridin und 15 MeV Neutronen.
Dissertation, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1971)

Pittner, W., Porschen, W., Feinendegen, L.E.
In-vivo-Messung unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit
von Tumorzellen während des Zellzyklus, Zellmarkierung mit
 ^{125}I -desoxyuridin.
Strahlentherapie, 145, 161-168, (1973)

Porschen, R., Porschen, W., Feinendegen, L.E.
Applicability of the $^{125}\text{IUdR}$ in situ Method for Measuring Cell Loss
in a Solid Adenocarcinoma.
Br. J. Cancer, 41, Suppl. IV, 105 (1980).

Porschen, W., Feinendegen, L.E.
In-vivo-Bestimmung der Zellverlustrate bei Experimental-
tumoren mit markiertem Joddeoxyuridin.
Strahlentherapie, 137, 718-723, (1969)

Porschen, W., Feinendegen, L.E.
Biologische In-vivo-Dosimetrie von 15 MeV-Neutronen bei
normalen und Tumorzellen - Zellmarkierung mit Jod- 125 -
Desoxyuridin.
Strahlentherapie, 145, 27-38, (1973)

Porschen, W., Feinendegen, L.E., Mühlensiepen, H.
Piepenbring, W., Bosiljanoff, P.
In Vivo Measurements of Radiosensitivity of Different
Cell Populations within Sarcoma-180 in Mice.
5th International Congress of Radiation Research,
Seattle, Washington, July 14-20, (1974)

Porschen, W., Bosiljanoff, P., Gewehr, K., Mühlensiepen, H.,
Weber, H.-J., Dietzel, F., Feinendegen, L.E.
In Vivo Assay of the Radiation Sensitivity of Hypoxic
Tumor Cells.
Radiobiological Research and Radiotherapy, Vol. I,
IAEA-SM-212/16, 181-194, Vienna, (1977)

Porschen, W., Gartzten, J., Gewehr, K., Mühlensiepen, H.,
Weber, H.-J., Feinendegen, L.E.
In Vivo Assay of the Radiation Sensitivity of Hypoxic Tumor
Cells; Influence of Gamma-Rays, Cyclotron Neutrons,
Misonidazole, Hyperthermia and Mixed Modalities.
Br. J. Cancer, 37, Suppl. III, 194-197, (1978)

Porschen, W., Pittner, W., Feinendegen, L.E.
Cell Loss Rate in Experimental Tumors Following 14 MeV-
Neutron Irradiation. In Vivo Experiments with Labeled
Iododeoxyuridine.
4th International Congress on Radiation Research
Evian, June 29 - July 4, (1970)

Porschen, W., Mühlensiepen, H., Porschen, R., Feinendegen, L.E.
In Vivo Analysis of the Effects of Cis-Dichloro-Diammine-
Platinum-II and Gamma- or Neutron Irradiation on a Solid
Tumor (Adenocarcinoma EO 771)
6th International Congress of Radiation Research, Tokyo,
May 13 - 19, (1979a)

Porschen, W., Mühlensiepen, H., Engelmann-Brunner, S.,
Weber, H.-J.
Persönliche Mitteilungen, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1979b)

Post, J., Huang, Ch., Hoffmann, J.
The Replication Time and Pattern of the Liver Cell in the
Growing Rat.
J. Cell Biol., 18, 1-11, (1963)

Post, J., Hoffmann, J.
The Effects of 5-Iodo-2'-Deoxyuridine upon the Replication of
Ileal and Spleen Cells in Vivo.
Cancer Res., 29, 1859-1865, (1969)

Prusoff, W.H.
Incorporation of Iododeoxyuridine, an Analog of Thymidine,
into Mammalian Deoxyribonucleic Acid.
Fed. Proc., 18, 305, (1959 a)

Prusoff, W.H.

Synthesis and Biological Activities of Iododeoxyuridine,
an Analogue of Thymidine.

Biochim. Biophys. Acta, 32, 295-296, (1959 b)

Prusoff, W.H.

Studies on the Mechanism of Action of 5-Iododeoxyuridine,
an Analogue of Thymidine.

Cancer Res., 20, 92-95, (1960)

Prusoff, W.H., Jaffe, J.J., Günther, H.

Studies in the Mouse of the Pharmacology of 5-Iodo-
Deoxyuridine, an Analogue of Thymidine.

Biochem. Pharm., 3, 110-121, (1960)

Quastler, H.

Effects of Irradiation on Synthesis and Loss of DNA.

Actions chimiques et biologiques des radiations

Collection dirigée par M. Haissinsky

Masson et Cie Editeurs, Paris, (1963)

Reid, J.C., White, J.

An Autoradiographic Study of Tumor Dynamics.

J. Nat. Cancer Inst., 22, 845-867, (1959)

Ribbert, H.

Über das Gefäßsystem und die Heilbarkeit der Geschwülste.

Deutsche Med. Wochenschrift, 30 (22), 801-803, (1904)

Riley, V., Wroblewski, F.

Serial Lactic Dehydrogenase Activity in Plasma of
Mice with Growing or Regressing Tumors.

Science, 132, 151-152, (1960)

Riley, V.

Enzymatic Determination of Transmissible Replicating
Factors Associated with Mouse Tumors.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 100, 762-790, (1963)

Riley, V., Huerto, E., Loveless, J.D., Bardell, D.,

Fitzmaurice, M., Forman, C.

Inapparent Transmissible Agents in Oncology and their
Influence on Tumor and Host.

Acta Unio internationalis contra cancrum, 19, 263-270, (1963)

Robert, J., Martin, J., Burg, C.

Evolution de la vascularisation d'une tumeur isologue
solide de la souris au cours de sa croissance.

Strahlentherapie, 133, 621-630, (1967)

- Rogers, W., Edlich, R.F., Lewis, D.V., Aust, J.B.
Tumor Blood Flow: I. Blood Flow in Transplantable Tumors during Growth.
Surgical Clinics of North America, 47 (6), 1473-1482, (1967)
- Roti Roti, J.L., Bohling, V., Dethlefsen, L.A.
Kinetic Models of C3H Mouse Mammary Tumor Growth: Implications Regarding Tumor Cell Loss.
Cell Tissue Kinet., 11, 1-21, (1978)
- Rubin, P., Casarett, G.
Microcirculation of Tumors
Part I: Anatomy, Function, and Necrosis.
Clin. Radiol., 17, 220-229, (1966 a)
- Rubin, P., Casarett, G.
Microcirculation of Tumors
Part II: The Supervascularized State of Irradiated Regressing Tumors.
Clin. Radiol., 17, 346-355, (1966 b)
- Sandritter, W., Beneke, G.
Allgemeine Pathologie.
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, (1974)
- Sapirstein, L.A.
Regional Blood Flow by Fractional Distribution of Indicators.
Am. J. Physiol., 193 (1), 161-168, (1958)
- Schatten, W.E.
An Experimental Study of Necrosis in Tumors.
Cancer Res., 22, 286-290, (1962)
- Schoefl, G.J.
Studies on Inflammation
III. Growing Capillaries: Their Structure and Permeability.
Virchows Arch. path. Anat., 337, 97-141, (1963)
- Schwarting, W.
Kontinuierliche Zellmarkierung mit intraperitoneal appliziertem ¹²⁵I-Jod-Desoxyuridin gebunden an Aktivkohle, in-vivo Untersuchung am Sarkom 180.
Ingenieurarbeit, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1973/74)
- Shapiro, D.M., Landing, B.H.
Significance of Distribution of Fluorescein in Sarcoma 180.
Science, 108, 304-305, (1948)

Shohat, B., Gitter, S., Levie, B., Lavie, D.
The Combined Effect of Cucurbitacins and X-Ray Treatment
on Transplanted Tumors in Mice.
Cancer Res., 25 (10), 1828-1835, (1965)

Shohat, B., Kott, E., Bornstein, B.
The Effect of L-Dopa, Noradrenalin and Adrenalin
on P-388 Mouse Leukemia, B-16 Mouse Melanoma and
E 0771 Mammary Carcinoma.
Experientia, 31, 110-111, (1975)

Silini, G., Maruyama, Y.
Studies of the LSA Ascites Lymphoma of C57 BL Mice
I. Transplantation Characteristics and Radiosensitivity
of Cells During Serial Passages.
J. Nat. Cancer Inst., 35, 841-849, (1965)

Simpson-Herren, L., Blow, G., Brown, P.H.
The Mitotic Cycle of Sarcoma 180.
Cancer Res., 28, 724-726, (1968)

Simpson-Herren, L., Lloyd, H.H.
Kinetic Parameters and Growth Curves for Experimental
Tumor Systems.
Cancer Chemotherapy Reports, 54 (3), 143-174, (1970)

Simpson-Herren, L.
Kinetics and Tumor Models.
Cancer Chemotherapy Reports, 5 (1), 83-88, (1975)

Snell, G.D., Cloudman, A.M., Woodworth, E.
Tumor Immunity in Mice, Induced with Lyophilized Tissue,
as Influenced by Tumor Strain, Host Strain, Source of
Tissue, and Dosage.
Cancer Res., 8, 429-437, (1948)

Snell, G.D., Russell, E., Fekete, E., Smith, P.
Resistance of Various Inbred Strains of Mice to
Tumor Homoiotransplants, and its Relation to the
H-2 Allele Which Each Carries.
J. Nat. Cancer Inst., 14, 485-491, (1953)

Sommer, I.
Bestimmung der Zellverlustrate als Funktion des Tumoralters.
In-vivo-Bestimmung mit 5-Jod-2'-Desoxyuridin.
Ingenieurarbeit, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1976)

- Song, C.W., Levitt, S.H.
Vascular Changes in Walker 256 Carcinoma of Rats
Following X-Irradiation.
Radiology, 100, 397-407, (1971)
- Spencer, R.P., Lang, B.J.
Quantification of Studies of Blood Flow in Growing
and Irradiated Tumors in C3H Mice.
Growth, 40, 211-216, (1976)
- Stecher, G., Bloemertz, H., Pfitzer, P.
Sarkom 180: Wachstum und Regression.
Beiträge zur Pathologie, 158, 255, (1976)
- Steel, G.G.
Delayed Uptake by Tumours of Tritium from Thymidine.
Nature, 210, 806-808, (1966)
- Steel, G.G., Adams, K., Barrett, J.C.
Analysis of the Cell Population Kinetics of
Transplanted Tumours of Widely-Differing Growth Rate.
Brit. J. Cancer, 20, 784-800, (1966)
- Steel, G.G.
Cell Loss as a Factor in the Growth Rate of
Human Tumors.
Europ. J. Cancer, 3, 381-387, (1967)
- Steel, G.G.
Cell Loss from Experimental Tumours.
Cell Tissue Kinet., 1, 193-207, (1968)
- Steel, G.G., Adams, K., Hodgett, J., Janik, P.
Cell Population Kinetics of a Spontaneous Rat
Tumour during Serial Transplantation.
Br. J. Cancer, 25, 802-811, (1971)
- Steel, G.G.
The Cell Cycle in Tumours: An Examination of Data
Gained by the Technique of Labelled Mitoses.
Cell Tissue Kinet., 5, 87-100, (1972)
- Steel, G.G.
Growth Kinetics of Tumours
Cell Population Kinetics in Relation to the Growth and
Treatment of Cancer.
Clarendon Press, Oxford, (1977)

Sugiura, K., Stock, C.C.

Studies in a Tumor Spectrum

I. Comparison of the Action of Methylbis (2-chloroethyl) amine and 3-Bis (2-chloroethyl) aminomethyl-4-methoxymethyl - 5 -hydroxy-6-methylpyridine on the Growth of a Variety of Mouse and Rat Tumors.
Cancer, 5 (2), 382-402, (1952)

Sugiura, K., Stock, C.C., Reilly, H.C., Schmid, M.M.

Studies in a Tumor Spectrum

VII. The Effect of Antibiotics on the Growth of a Variety of Mouse, Rat, and Hamster Tumors.
Cancer Res., 18, 66-77, (1958)

Sugiura, K.

Frozen Storage of 34 Various Solid and Ascites Tumors.
Cancer Res., 21, 496-501, (1961)

Sugiura, K.

Studies in a Spectrum of Mouse, Rat and Hamster Tumours.
Cancer Res., 22, 93-135, (1962)

Sugiura, K., Tortolani, A.J., Sargent, M.G.

Viability of Various Solid and Ascites Tumors after Prolonged Storage at -78° C.
Cryobiology, 4 (4), 177-183, (1968)

Sylvén, B., Holmberg, B.

On the Structure and Biological Effects of a Newly Discovered Cytotoxic Polypeptide in Tumor Fluid.
Europ. J. Cancer, 1, 199-202, (1965)

Szczepanski, L.v., Trott, K.-R.

Post-Irradiation Proliferation Kinetics of a Serially Transplanted Murine Adenocarcinoma.
Br. J. Radiol., 48, 200-208, (1975)

Tanaka, Y.

Regional Tumor Blood Flow and Radiosensitivity.
Fraction Size in Radiobiology and Radiotherapy.
Editors: T. Sugahara, Kyoto, L. Révész, Stockholm
O.C.A. Scott, London
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien
Igaku Shoin Ltd., Tokyo, 13-26, (1974)

Tannock, I.F.

The Relation between Cell Proliferation and the Vascular System in a Transplanted Mouse Mammary Tumour.
Brit. J. Cancer, 22, 258-273, (1968)

Tannock, I.F., Steel, G.G.

Quantitative Techniques for Study of the Anatomy and Function of Small Blood Vessels in Tumors.

J. Nat. Cancer Inst., 42, 771-782, (1969)

Tannock, I.F., Steel, G.G.

Tumor Growth and Cell Kinetics in Chronically Hypoxic Animals.

J. Nat. Cancer Inst., 45, 123-133, (1970)

Tannock, I.F.

Population Kinetics of Carcinoma Cells, Capillary Endothelial Cells, and Fibroblasts in a Transplanted Mouse Mammary Tumor.

Cancer Res., 30, 2470-2476, (1970)

Tannock, I.F.

Oxygen Diffusion and the Distribution of Cellular Radiosensitivity in Tumours.

Brit. J. Radiol., 45, 515-524, (1972)

Thomlinson, R.H., Gray, L.H.

The Histological Structure of some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy.

Br. Journal of Cancer, 9, 539-549, (1956)

Ting, T.P.

A Method for Quantitative Evaluation of the Effects of Ionizing Radiations on Growth of Adenocarcinoma in Vivo.

Science, 116, 149-151, (1952)

Vaage, J.

The Immunogenic Activity of Tumor Antigens Retained by the Reticuloendothelial Cells of Tumor-bearing Mice.

Cancer Res., 32, 898-903, (1972)

Vogel, A.W.

Intratumoral Vascular Changes with Increased Size of a Mammary Adenocarcinoma: New Method and Results.

J. Nat. Cancer Inst., 34, 571-578, (1965)

Warburg, O.

On the Origin of Cancer Cells.

Science, 123, 309-314, (1956)

Warren, B.A., Shubik, P.

The Growth of the Blood Supply to Melanoma Transplants in the Hamster Cheek Pouch.

Lab. Investig., 15 (2), 464-478, (1966)

Watson, J.V.

The Cell Proliferation Kinetics of the EMT6/M/AC
Mouse Tumour at Four Volumes during Unperturbed
Growth in Vivo.

Cell Tissue Kinet., 9, 147-156, (1976 a)

Watson, J.V.

The Perturbed Cell Proliferation Kinetics of the
EMT6/M/AC Tumour in Mice Treated with Anti-Mouse
Lymphocyte Serum.

Cell Tissue Kinet., 9, 565-571, (1976 b)

Weber, H.-J.

In-vivo-Untersuchungen über die Kombinationseffekte
von Hyperthermie und Co-60-Bestrahlung auf oxische
und hypoxische Tumorzellen bei einem soliden
Experimentaltumor (Sarkom 180). Zellmarkierung mit
Jod-Desoxyuridin.

Diplomarbeit, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1976)

Wießner, N.

Der Einfluß von Ganzkörperbestrahlung auf die Körper-
eigene Abwehr bei Tumormäusen.

Zellmarkierung mit ¹²⁵Jod-Desoxyuridin.

Ingenieurarbeit, IME, Kernforschungsanlage Jülich, (1972)

Williams, R.G.

The Vascularity of Normal and Neoplastic Grafts in Vivo.
Cancer Res., 11, 139-147, (1951)

Wollman, S.H., Reed, F.E.

Clearance of Blood Radioiodide by Transplantable Tumors
of the Thyroid Gland in the Unanesthetized Rat.

J. Nat. Cancer Inst., 31, 1479-1487, (1963)

Woo, K.B., Wiig, K.M., Brenkus, L.M.

Variation of Cell Kinetic Parameters in Relation
to the Growth Rate of the Ehrlich Ascites Tumor.

Cell Tissue Kinet., 8, 387-390, (1975)

Zentralinstitut für Versuchstierzucht

Jahresbericht 1974

Hannover-Linden, November (1974)

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. L.E. Feinendegen, Direktor des Instituts für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich, danke ich aufrichtig für die interessante Themenstellung, für die Möglichkeit, in seinem Institut arbeiten zu können, und für seine anhaltende Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. P. Pfitzer, Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf, danke ich sehr herzlich für die hilfsbereite Anfertigung der Tumorschnitte und die Beurteilung der histologischen Präparate.

• Herrn Dr. rer. nat. W. Porschen bin ich zu herzlichem Dank verpflichtet für die Gelegenheit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können, und für seine Hilfe bei auftretenden Problemen.

Herrn Phys. Ing. H. Mühlensiepen gilt mein besonderer Dank, da seine stets hilfsbereite Mitarbeit besonders in versuchstechnischer Hinsicht viel zum Fortgang der Arbeit beitrug.

Herrn Dr. Bierling, Bayer AG Wuppertal, gilt mein Dank für die freundliche Überlassung des Tumors.

Bei allen, die durch ihre praktischen Hilfen, ihre Anregungen und Diskussionen diese Arbeit erleichtert haben, möchte ich mich herzlich bedanken. Ohne ihre Mitwirkung hätte sie wesentlich mehr Zeit in Anspruch genommen.

Lebenslauf

Am 12. Mai 1954 wurde ich, Rainer Porschen, als Sohn des Diplom-Physikers Dr. Walter Porschen und seiner Ehefrau Irmgard Porschen, geb. Bode, in Bonn geboren.

Von 1960 bis 1965 besuchte ich die Katholische Volksschule Jülich, Düsseldorfer Straße, und wechselte dann zum Staatlichen Gymnasium Jülich, wo ich am neusprachlichen Zweig das Abitur am 15. Mai 1973 bestand.

Zum Wintersemester 1973/74 wurde ich in der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen immatrikuliert. Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im Sommer 1975 ab. Das klinische Studium in Aachen wurde durch einen Studienaufenthalt in Wien im Sommersemester 1976 unterbrochen. Im August 1976 begann ich meine Tätigkeit als Doktorand am Institut für Medizin in der Kernforschungsanlage Jülich.

Mein Praktisches Jahr absolvierte ich am St. Antonius-Hospital in Eschweiler. Nach der am 22. Oktober 1980 bestandenen Ärztlichen Prüfung bin ich seit dem 1. März 1981 in der Inneren Abteilung des Krankenhauses St. Elisabeth in Jülich als Assistenzarzt beschäftigt.

Jülich, den 15. Mai 1981

Rainer Porschen

